

MARCELO SÉRGIO SOUZA WIECHETECK

Micropropagação de *Eucalyptus viminalis* Labill.  
A Partir de Material Juvenil

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau e título de Mestre em Ciências Florestais

CURITIBA  
1990

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
COORDENAÇÃO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL

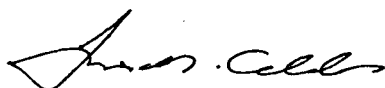
P A R E C E R

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado apresentada pelo candidato MARCELO SÉRGIO SOUZA WIECHETECK, sob o título "MICROPROPAGAÇÃO DE *Eucalyptus viminalis* Labill. A PARTIR DE MATERIAL JUVENIL" para obtenção do grau de Mestre em Ciências Florestais - Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná. Área de concentração em SILVICULTURA, após haver analisado o referido trabalho e arguido o candidato, são de parecer pela "APROVAÇÃO" da Dissertação completando assim os requisitos necessários para receber o grau e o Diploma de Mestre em Ciências Florestais.

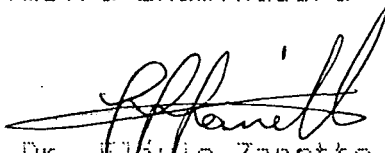
Observação:

O critério de aprovação da Dissertação e Defesa da mesma a partir de novembro de 1980 é apenas, APROVADA ou NÃO APROVADA.

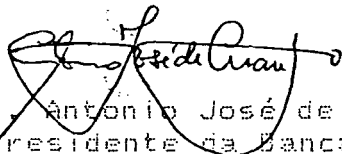
Curitiba, 21 de fevereiro de 1990.



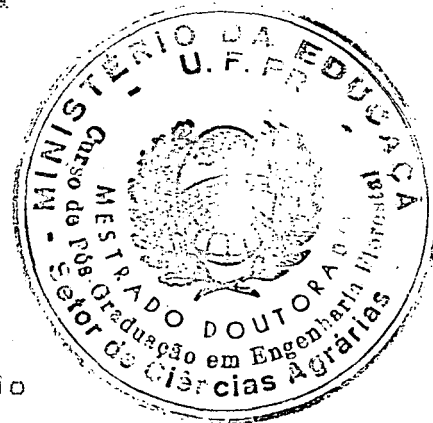
Profa. Ph.D. Linda Styer Calda  
Primeira Examinadora



Prof. Dr. Flávia Zanette  
Segundo Examinador



Prof. Dr. Antonio José de Araujo  
Presidente da Banca



à minha família,

dedico

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antonio José de Araujo, pela orientação e valiosas sugestões na realização deste trabalho.

A pesquisadora do CNPF/EMBRAPA, Dra. Maria Elisa Cortezzi Graça, pela inestimável contribuição, co-orientação e estímulo.

Ao Prof. Dr. Flávio Zanette e Prof. Dr. Mário Takao Inoue pela indispensável colaboração e co-orientação.

Ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal da Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade de realização do mestrado.

Ao Centro Nacional de Pesquisa de Florestas (CNPF/EMBRAPA), pelo apoio técnico prestado.

Ao Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo da UFPR, na pessoa do Prof. Dr. Flávio Zanette, pela cessão do laboratório e de materiais para a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pela concessão de bolsa de estudo.

Ao convênio UFPR/ALBERT-LUDWIG UNIVERSITÄT, na pessoa do Prof. Dr. Mário Takao Inoue, pela liberação de recursos financeiros para o início do trabalho de laboratório.

Ao Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, atual IBAMA, pela cessão de mudas de *Eucalyptus viminalis*.

Ao ex-pesquisador do CNPFT/EMBRAPA, Márcio de Assis, M.Sc. pela contribuição no estágio técnico realizado sob sua supervisão.

Ao pesquisador do CNPF/EMBRAPA, Edilson Batista de Oliveira, M.Sc., pelo auxílio nas análises estatísticas.

À PISA FLORESTAL S.A., na pessoa do Diretor Florestal Engº Adhemar Villela Filho, pelo apoio e colaboração prestados durante a realização do estudo.

À minha família pela atenção dedicada.

À Rosane e aos amigos Eliane Nascimento, Eliane Hupfeld, Carmem, Orlando, Diva, Moacyr, Leide, Sandra, Paulo, Marta, Luciana, Cecília, Selma, Luiz César, Romualdo, Schandler e Henrique pelo auxílio e estímulo prestados.

Aos funcionários da Escola de Florestas/UFPR, do laboratório de micropropagação do Setor de Ciências Agrárias da UFPR, do CNPF/EMBRAPA e da PISA pelo apoio prestado.

As bibliotecárias do Setor de Ciências Agrárias da UFPR e do CNPF/EMBRAPA, pela amizade e disposição na busca de material bibliográfico.

À todos que de alguma forma prestaram apoio na realização deste trabalho.

## BIOGRAFIA DO AUTOR

Marcelo Sérgio Souza Wiecheteck, filho de Arnaldo Wiecheteck e Nadazir Souza Wiecheteck, nasceu em Ponta Grossa, Paraná, a 7 de março de 1963.

Concluiu o 1º grau no Colégio da Polícia Militar e o 2º grau no Colégio Positivo, ambos em Curitiba, PR.

Em 1980, iniciou o Curso de Engenharia Florestal na Universidade Federal do Paraná, graduando-se em 1983.

Em março de 1984 deu início ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, nível de Mestrado, na área de concentração Silvicultura, na Universidade Federal do Paraná, concluindo os créditos em dezembro de 1985.

Desde janeiro de 1986 é engenheiro florestal da PISA Florestal S.A., onde ocupa atualmente o cargo de chefe do Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento Florestal.

## SUMÁRIO

	LISTA DE TABELAS .....	ix
	LISTA DE FIGURAS .....	xiii
	LISTA DE ABREVIATURAS .....	xv
	RESUMO .....	xvi
1	INTRODUÇÃO .....	1
2	REVISÃO DE LITERATURA .....	8
	2.1 Eucalyptus viminalis Labill .....	8
	2.2 TÉCNICAS DE CULTURA <i>in vitro</i> .....	9
	2.3 VANTAGENS DA CULTURA DE PLANTAS <i>in vitro</i> ....	11
	2.4 PROBLEMAS ASSOCIADOS COM AS TÉCNICAS DE CULTURA <i>in vitro</i> .....	12
	2.5 MICROPROPAGAÇÃO DE Eucalyptus .....	14
	2.5.1 Fonte de explantes para Eucalyptus ....	14
	2.5.2 Resultados alcançados na micropropagação de Eucalyptus .....	16
	2.5.2.1 Aspectos relacionados com o cultivo <i>in vitro</i> .....	16
	2.5.2.2 Cultura de calos de Eucalyptus .....	18
	2.5.2.3 Cultura de órgãos de Eucalyptus .....	19
	2.5.2.4 Taxa de multiplicação.....	23
	2.5.2.5 Custos envolvidos .....	24
3	MATERIAIS E MÉTODOS .....	25
	3.1 CONDIÇÕES AMBIENTAIS DAS CULTURAS .....	25
	3.2 MEIOS DE CULTURA E RECIPIENTES .....	25
	3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	26
	3.4 FONTE DE EXPLANTES .....	27

3.5	DESINFESTAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL .....	28
3.6	MULTIPLICAÇÃO DAS BROTAÇÕES .....	29
3.7	ALONGAMENTO DAS BROTAÇÕES .....	31
3.8	ENRAIZAMENTO DAS BROTAÇÕES .....	32
4	<u>RESULTADOS E DISCUSSÃO</u> .....	34
4.1	DESINFESTAÇÃO DO MATERIAL .....	34
4.1.1	Contaminação .....	36
4.1.2	Oxidação .....	38
4.1.3	Sobrevivência .....	38
4.2	MULTIPLICAÇÃO DAS BROTAÇÕES .....	45
4.2.1	Subcultivo 1 de multiplicação .....	45
4.2.1.1	Brotações multiplicadas .....	45
4.2.1.2	Aspecto das brotações .....	50
4.2.2	Subcultivo 2 de multiplicação .....	52
4.2.2.1	Brotações multiplicadas.....	52
4.2.2.2	Aspecto das brotações .....	56
4.3	ALONGAMENTO DE BROTAÇÕES .....	60
4.3.1	Experimento 1 de alongamento .....	60
4.3.2	Experimento 2 de alongamento .....	64
4.4	ENRAIZAMENTO .....	73
5	<u>CONCLUSÕES</u> .....	79
	<u>ANEXOS</u> .....	81
	<u>ABSTRACT</u> .....	86
	<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u> .....	87



## LISTA DE TABELAS

1.	EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE HIPOCLORITO DE SÓDIO E PERÍODO DE EXPOSIÇÃO NA DESINFESTAÇÃO DE EXPLANTES NODAIS DE <i>Eucalyptus viminalis</i> , APÓS QUATRO SEMANAS DE INCUBAÇÃO.....	35
2.	EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE HIPOCLORITO DE SÓDIO E PERÍODO DE EXPOSIÇÃO SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE GEMAS EM EXPLANTES NODAIS DE <i>Eucalyptus viminalis</i> , APÓS QUATRO SEMANAS DE INCUBAÇÃO....	43
3.	EFEITO COMBINADO DAS CONCENTRAÇÕES DE BAP E ANA NA MULTIPLICAÇÃO DE BROTAÇÕES DE <i>Eucalyptus viminalis</i> , APÓS OITO SEMANAS DE INCUBAÇÃO (SUB-CULTIVO 1).....	46
4.	EFEITO DA COMBINAÇÃO DE BAP E ANA SOBRE O ASPECTO DAS BROTAÇÕES MULTIPLICADAS DE <i>Eucalyptus viminalis</i> , APÓS OITO SEMANAS DE INCUBAÇÃO (SUB-CULTIVO 1).....	51
5.	EFEITO COMBINADO DA CONCENTRAÇÃO DE BAP E ANA NA MULTIPLICAÇÃO DE BROTAÇÕES DE <i>Eucalyptus viminalis</i> , APÓS OITO SEMANAS DE INCUBAÇÃO (SUB-CULTIVO 2) .....	53
6.	EFEITO DA COMBINAÇÃO DE BAP E ANA SOBRE O AS-	

	PECTO DE BROTAÇÕES MULTIPLICADAS DE <i>Eucalyptus viminalis</i> , APÓS OITO SEMANAS DE INCUBAÇÃO (SUB-CULTIVO 2).....	58
7.	EFEITO DO MEIO DE CULTURA, ADIÇÃO SUPLEMENTAR DE NITROGÊNIO E REGIME DE LUZ SOBRE A ALTURA DE BROTAÇÕES DE <i>Eucalyptus viminalis</i> , APÓS QUATRO SEMANAS DE INCUBAÇÃO.....	61
8.	EFEITO DO MEIO DE CULTURA ASSOCIADO COM ADIÇÃO SUPLEMENTAR DE NITROGÊNIO SOBRE A ALTURA DE BROTAÇÕES DE <i>Eucalyptus viminalis</i> , APÓS QUATRO SEMANAS DE INCUBAÇÃO.....	62
9.	EFEITO DA ADIÇÃO SUPLEMENTAR DE NITROGÊNIO ASSOCIADA COM O REGIME DE LUZ SOBRE A ALTURA DE BROTAÇÕES DE <i>Eucalyptus viminalis</i> , APÓS QUATRO SEMANAS DE INCUBAÇÃO.....	63
10.	MÉDIAS DE ALONGAMENTO DE BROTAÇÕES DE <i>Eucalyptus viminalis</i> , COMO EFEITO DO USO COMBINADO DE C.A., GA <sub>3</sub> E AIB, APÓS QUATRO SEMANAS DE INCUBAÇÃO.....	65
11.	EFEITO DO C.A. ASSOCIADO COM GA <sub>3</sub> SOBRE A ALTURA DE BROTAÇÕES DE <i>Eucalyptus viminalis</i> , APÓS QUATRO SEMANAS DE INCUBAÇÃO.....	67

12.	EFEITO DO C.A. ASSOCIADO COM AIB SOBRE A ALTURA DE BROTAÇÕES DE <i>Eucalyptus viminalis</i> , APÓS QUATRO SEMANAS DE INCUBAÇÃO.....	69
13.	EFEITO DO GA <sub>3</sub> ASSOCIADO COM AIB SOBRE A ALTURA DE BROTAÇÕES DE <i>Eucalyptus viminalis</i> , APÓS QUATRO SEMANAS DE INCUBAÇÃO.....	71
14.	EFEITO DA COMBINAÇÃO DE MEIO DE CULTURA, AIB E KIN SOBRE O ENRAIZAMENTO DE BROTAÇÕES DE <i>Eucalyptus viminalis</i> , APÓS SEIS SEMANAS DE INCUBAÇÃO.....	74
15.	EFEITO RELATIVO DO MEIO DE CULTURA, AIB E KIN SOBRE O ENRAIZAMENTO TOTAL E ASPECTO DAS BROTAÇÕES DE <i>Eucalyptus viminalis</i> , APÓS SEIS SEMANAS DE INCUBAÇÃO.....	75
1A	ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA MULTIPLICAÇÃO DE BROTAÇÕES NO SUBCULTIVO 1 .....	82
2A	ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA MULTIPLICAÇÃO DE BROTAÇÕES NO SUBCULTIVO 2 .....	83
3A	ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO ALONGAMENTO DE BROTAÇÕES NO EXPERIMENTO 1 .....	84

4A	ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO ALONGAMENTO DE BROTA-	
	ÇÕES NO EXPERIMENTO 2 .....	85

## LISTA DE FIGURAS

1. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE HIPOCLORITO DE SÓDIO E PERÍODO DE EXPOSIÇÃO SOBRE A CONTAMINAÇÃO DE EXPLANTES NODAIS DE *Eucalyptus viminalis*, APÓS QUATRO SEMANAS DE INCUBAÇÃO..... 37
2. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE HIPOCLORITO DE SÓDIO E PERÍODO DE EXPOSIÇÃO SOBRE A OXIDAÇÃO DE EXPLANTES NODAIS DE *Eucalyptus viminalis*, APÓS QUATRO SEMANAS DE INCUBAÇÃO..... 39
3. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE HIPOCLORITO DE SÓDIO E PERÍODO DE EXPOSIÇÃO SOBRE A SOBREVIVÊNCIA DE EXPLANTES NODAIS DE *Eucalyptus viminalis*, APÓS QUATRO SEMANAS DE INCUBAÇÃO..... 41
4. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE HIPOCLORITO DE SÓDIO E PERÍODO DE EXPOSIÇÃO SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE GEMAS EM EXPLANTES NODAIS DE *Eucalyptus viminalis*, APÓS QUATRO SEMANAS DE INCUBAÇÃO..... 44
5. EFEITO DAS CONCENTRAÇÕES DE BAP, DENTRO DO FATOR ANA, SOBRE A MULTIPLICAÇÃO DE *Eucalyptus viminalis*, APÓS OITO SEMANAS DE INCUBAÇÃO (SUBCULTIVO 1) ..... 48
6. EFEITO DAS CONCENTRAÇÕES DE ANA, DENTRO DO FA-

	TOR BAP, SOBRE A MULTIPLICAÇÃO DE <i>Eucalyptus</i> <i>viminalis</i> , APÓS OITO SEMANAS DE INCUBAÇÃO (SUB- CULTIVO 1) .....	49
7.	EFEITO DAS CONCENTRAÇÕES DE ANA, DENTRO DO FA- TOR BAP, SOBRE A MULTIPLICAÇÃO DE <i>Eucalyptus</i> <i>viminalis</i> , APÓS OITO SEMANAS DE INCUBAÇÃO (SUB- CULTIVO 2) .....	55
8.	EFEITO DAS CONCENTRAÇÕES DE BAP, DENTRO DO FA- TOR ANA, SOBRE A MULTIPLICAÇÃO DE <i>Eucalyptus</i> <i>viminalis</i> , APÓS OITO SEMANAS DE INCUBAÇÃO (SUB- CULTIVO 2) .....	57
9.	EFEITO DO GA <sub>3</sub> , EM COMBINAÇÃO COM C.A. E AIB, SOBRE A ALTURA DE BROTAÇÕES DE <i>Eucalyptus vi-</i> <i>minalis</i> , APÓS QUATRO SEMANAS DE INCUBAÇÃO.....	68
10.	EFEITO DO MEIO DE CULTURA E KIN, DENTRO DO FATOR AIB, SOBRE O ENRAIZAMENTO DE BROTAÇÕES DE <i>Eucalyptus viminalis</i> , APÓS SEIS SEMANAS DE INCUBAÇÃO.....	76

## LISTA DE ABREVIATURAS

1. AIA - ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO
2. AIB - ÁCIDO INDOL-3-BUTÍRICO
3. ANA - ÁCIDO  $\alpha$ -NAFTELENO-ACÉTICO
4. BAP - 6-BENZILAMINOPURINA
5. C.A. - CARVÃO ATIVADO
6. 2,4-D - ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO
7. GA<sub>3</sub> - ÁCIDO GIBERÉLICO
8. KIN - CINETINA
9. MS - MURASHIGE & SKOOG
10. MS/2 - MS com metade das concentrações de sais
11. P/V - RELAÇÃO PESO/VOLUME
12. V/V - RELAÇÃO VOLUME/VOLUME
13. IMA - INCREMENTO MÉDIO ANUAL

## RESUMO

A regeneração de plantas de *Eucalyptus viminalis* Labill. foi obtida através da micropropagação de segmentos nodais de mudas. O desenvolvimento da técnica consistiu da adequação das fases de desinfestação dos explantes e multiplicação, alongamento e enraizamento de brotações, sob condições assépticas e controladas de incubação. O meio de cultura básico foi o de MURASHIGE & SKOOG (MS), suplementado com 2 % (P/V) de sacarose e solidificado com 0,8 % (P/V) de ágar, além das vitaminas descritas por GAMBORG & WETTER. Segmentos nodais com aproximadamente 1 cm de comprimento, obtidos de mudas de 1 ano, foram desinfestados em solução de 1 ou 2 % de hipoclorito de sódio durante 5, 10 ou 15 min. Tais explantes foram cultivados em meio MS com metade da concentração dos sais, com adição de BAP e ANA, ambos na concentração de  $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ . Na multiplicação empregou-se a combinação de diferentes concentrações de BAP e ANA. Na fase de alongamento, efetuou-se a combinação de concentrações de sais no meio de cultura com adição suplementar de nitrogênio e regimes de luz, além da combinação de carvão ativado com GA<sub>3</sub> e AIB. No enraizamento, empregaram-se diferentes concentrações de AIB combinadas com cinetina, em meio MS ou MS/2. Explantes tratados com solução de 1 % de hipoclorito de sódio por 10 min apresentaram menores taxas de contaminação e oxidação e maior sobrevivência em relação aos demais tratamentos. Múltiplas brotações foram induzidas pela adição de  $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$  de BAP e  $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$  de ANA ao meio MS. No alongamento, o uso de carvão ativado, isoladamente, no meio MS, resultou no maior crescimento em altura das brotações. O uso do GA<sub>3</sub> mostrou-se detrimental para o alongamento. O melhor enraizamento foi obtido no meio MS/2 suplementado com  $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$  de AIB. Nesta fase, o meio MS/2 foi mais eficaz que o MS na formação de raízes. Na micropropagação de *Eucalyptus viminalis* a máxima taxa de multiplicação obtida foi de 5 a 6 brotações por explante, a cada 8 semanas, com percentagem de enraizamento de 66,6 %. Considerando o aspecto das brotações, a taxa ótima de multiplicação foi de 4,6 brotações por explante.



## 1 INTRODUÇÃO

Os eucaliptos constituem um dos mais importantes gêneros florestais, de interesse comercial a nível mundial. O rápido crescimento, a ampla adaptabilidade a diferentes ambientes e a utilização de seus produtos, associados à sua capacidade regenerativa, tem contribuído para um uso amplamente difundido em plantios comerciais (TURNBULL & BOULAND<sup>47</sup>). Por tais características, constituem-se em um dos gêneros florestais mais produtivos e com grande plasticidade (BONGA & DURZAN<sup>7</sup>).

Atualmente, o *Eucalyptus* vem apresentando importância crescente na produção de madeira e polpa, no Brasil e no mundo, por apresentar uma das mais elevadas taxas de produtividade florestal.

Em estudo publicado em 1980, já havia mais de 6 milhões de ha de plantios de *Eucalyptus* em mais de 60 países, perfazendo acima de 40 % de todo o plantio corrente nos trópicos (EVANS, citado por TURNBULL & BOULAND<sup>47</sup>). No Brasil, em 1986, já existiam acima de 3,2 milhões de ha reflorestados com *Eucalyptus*, com plantio anual da ordem de 200 mil ha (KENGEN<sup>34</sup>).

Espécies do gênero *Eucalyptus* tem merecido a atenção

EVANS, J. Prospects for eucalypts as forest trees in Great Britain. *Forestry*, 53:129-43, 1980.

de empresas e instituições de pesquisa no Brasil devido ao aumento crescente de novos plantios, em função de ganhos em produtividade florestal alcançados, visando atender a crescente demanda de madeira destinada à fins energéticos e de produção de celulose e papel.

Entre as espécies apropriadas para as áreas comumente sujeitas à geadas destaca-se o *Eucalyptus viminalis* Labill, por sua comprovada tolerância a este fator climático. No Brasil, a madeira de *Eucalyptus viminalis* é empregada principalmente na produção de carvão.

Segundo FISHWICK<sup>17</sup>, na região sul, o *E. viminalis*, de procedência desconhecida, é a espécie mais largamente empregada, com povoamentos produtivos na região de Canela, RS. A espécie é tolerante à geadas, suscetível ao déficit hídrico e apresenta boa capacidade de regeneração por brotações de cepas (EMPRESA<sup>16</sup>). Entretanto, esta espécie apresenta limitações quanto à produtividade e forma do fuste, o que parece ser devido à base genética restrita, existente no Brasil (FONSECA<sup>18</sup>).

Em ensaios de procedências de *Eucalyptus viminalis* em Lages, SC, a procedência de Batlow/NSW revelou-se como a melhor, com um IMA de  $75 \text{ m}^3 \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{ano}^{-1}$  e 16 % de falhas, aos 7 anos e meio. No estado do Paraná, o *E. viminalis* é uma das espécies mais recomendadas para plantio nas regiões bio-climáticas 1 e 2, que abrangem o centro-sul, quase até o planalto norte do estado. Entretanto, a única procedência da qual se dispõe de sementes para plantio em larga escala é a de Canela, RS que vem se comportando de maneira insatisfató-

ria quanto ao crescimento e forma das árvores (EMPRESA<sup>16</sup>). Ensaio mais recentes de introdução da espécie no País permitirão a constituição de uma base genética mais ampla para a seleção e melhoramento genético da mesma em nossas condições.

A maioria das espécies de *Eucalyptus* é propagada por sementes (BONGA & DURZAN<sup>7</sup>) e o seu melhoramento é um processo relativamente lento devido à extensão de sua fase juvenil antes da floração (DURAND-CRESSWELL et alii<sup>15</sup>). O *Eucalyptus viminalis* tem apresentado limitações quanto à regeneração por sementes em nossas condições (EMPRESA<sup>16</sup>). Adicionalmente, os povoamentos existentes no Brasil apresentam-se heterogêneos devido à alta variabilidade genética e má qualidade das sementes (FREITAS<sup>20</sup>).

Assim, a propagação vegetativa pode oferecer diversas vantagens para um programa de melhoramento, por possibilitar a perpetuação de características desejáveis e a rápida multiplicação de material genético para bancos clonais, pomares de sementes e plantios comerciais (DAVIDSON<sup>11</sup>). A propagação massal, através da clonagem de genótipos superiores selecionados, fornece ganho significativamente mais alto, em relação aos obtidos pelos métodos tradicionais, por reter tanto os efeitos dos genes aditivos quanto os dos não aditivos em um menor período de tempo (KARNOSKY<sup>33</sup>).

Os eucaliptos, como a maioria das demais espécies florestais, apresentam rotação relativamente longa, dificuldade no cruzamento para a produção de grande quantidade de híbridos, além da seleção de genótipos para características

importantes demandar alguns anos, podendo tornar seu melhoramento demorado e oneroso (HARTNEY<sup>29</sup>). Ainda segundo este autor, a propagação vegetativa de clones superiores poderia transpor estes problemas, à medida em que os mesmos possam ser rapidamente propagados para uso em plantios comerciais. A propagação vegetativa permitiria que indivíduos superiores de uma população originassem novos povoamentos, além de eventual vigor híbrido poder ser explorado.

Os métodos de propagação vegetativa comumente reconhecidos tem sido testados para *Eucalyptus* e, em sua maioria, tem mostrado resultados não promissores, principalmente quando aplicados em tecidos adultos. Segundo FURZE & CRESSWELL<sup>21</sup>, a propagação vegetativa pode apresentar problemas, pois quando as árvores atingem uma idade em que podem ser avaliadas, as mesmas já ultrapassaram o estágio que poderiam ser facilmente propagadas vegetativamente.

A propagação vegetativa de *Eucalyptus* utiliza-se de métodos clássicos como estaquia, enxertia e alporquia. A estaquia tem apresentado problemas relativos ao baixo índice de enraizamento, à medida em que se utilize material mais adulto, devido ao acúmulo de inibidores de enraizamento nos entrenós superiores (PATON et alii, citado por DURAND-CRESSWELL & NITSCH<sup>14</sup>). Mesmo a partir de material jovem, o enraizamento é baixo para algumas espécies de *Eucalyptus*.

PATON et alii. Rooting of stem cuttings of *Eucalyptus*: A rooting inhibitor in adult tissue. *Aust. J. Bot.*, 18:175-83, 1970.

Ao utilizar brotações epicórmicas induzidas de árvores adultas de *E. viminalis*, CUNNINGHAM & MOTT<sup>10</sup> encontraram um baixo percentual de enraizamento, apesar do sucesso obtido para outras espécies.

Discutindo a propagação vegetativa em *Eucalyptus*, HARTNEY<sup>28</sup> afirma que a enxertia não é um método de propagação em larga escala, além de apresentar problemas quanto à incompatibilidade entre o enxerto e o porta-enxerto. A alporquia, por sua vez, é de aplicação limitada devido às despesas e trabalhos envolvidos, bem como a dificuldade de ser realizada em árvores altas em campo (DAVIDSON<sup>11</sup>). Ambas as técnicas são onerosas, sendo aplicadas somente para fins especiais, como na implantação de jardins e pomares clonais (CRESSWELL & de FOSSARD<sup>9</sup>).

A micropropagação pode, desta forma, oferecer um método alternativo na propagação vegetativa de *Eucalyptus* (McKEAND & WEIR<sup>38</sup>). A cultura de células, órgãos e tecidos apresenta um potencial econômico considerável para se propagar genótipos selecionados de forma rápida e econômica (KARNOSKY<sup>33</sup>). A micropropagação oferece como vantagens sobre a estaquia uma taxa mais elevada de multiplicação, uma menor necessidade de espaço físico (a fim de se produzir e manter as plantas parentais), ausência de pragas e doenças durante a incubação, além de fornecer técnicas mais seguras, a medida em que se obtenha um maior controle dos fatores envolvidos (HARTNEY<sup>27</sup>).

A micropropagação de árvores adultas apresenta a vantagem de se trabalhar com genótipos comprovadamente superior-

res (BENNETT & McCOMB<sup>5</sup>). Entretanto, a regeneração de plantas tem sido mais difícil, devido à maior contaminação inicial da cultura por organismos patogênicos e às dificuldades do explante vir a se diferenciar em plântulas, principalmente quanto à fase de enraizamento. Estes problemas são menores com a micropropagação de material juvenil.

Para eucaliptos, no entanto, a micropropagação de material adulto pode ser substituída com êxito, utilizando-se material rejuvenescido a partir de brotações de rebrota de tocos ou injúrias em árvores adultas, as quais possuem características juvenis, podendo assim servir como fonte de material para a propagação vegetativa (HARTNEY<sup>27</sup>).

Embora não se conheça inicialmente o potencial genético de clones de mudas oriundas de sementes, a micropropagação de progênes valiosas de cruzamentos controlados ou de pomares de semente de elite pode ser de grande interesse ao se obter um número ilimitado de plantas a partir de uma quantidade limitada de sementes (BARKER et alii<sup>4</sup>). Ainda segundo estes autores, tais clones podem ser testados para algumas características de interesse ou sítio específico e mais tarde um grande número de plantas pode ser obtido a partir de um banco clonal de micropropagação.

Diversas espécies de *Eucalyptus* têm sido propagadas in vitro. Para o *Eucalyptus viminalis* poucos estudos foram realizados até o momento, tendo sido determinados os meios de cultura e algumas condições específicas para a multiplicação de brotações através da micropropagação. No entanto, não se determinaram condições para o enraizamento da espécie

(CUNNINGHAM & MOTT<sup>10</sup>), ou quando estudado obteve-se um baixo percentual de enraizamento (MEHRA-PALTA<sup>39</sup>).

Diversos autores tem relatado as potencialidades e os problemas associados com o uso deste método. Resultados significativos para outras espécies de *Eucalyptus* já foram obtidos e tem indicado a micropropagação como um método prático de propagação.

A medida em que a técnica seja aprimorada, a micropropagação poderá vir a ser um meio importante para uso nos futuros programas de melhoramento genético, ou mesmo na produção comercial de indivíduos superiores desta espécie.

O presente trabalho teve por objetivo o desenvolvimento de uma metodologia para a regeneração de plantas de *Eucalyptus viminalis* a partir da micropropagação de segmentos nodais de mudas.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 *Eucalyptus viminalis* Labill

O *Eucalyptus viminalis* Labill é uma espécie de hábito variável. Na Austrália podem ocorrer árvores de grandes dimensões, variando em geral entre 30 e 50 m de altura e 1,5 m de DAP. Na Tasmânia, sob condições favoráveis, ocasionalmente pode apresentar 90 m de altura e até 3 m de DAP. Entretanto, em locais secos ocorrem árvores com cerca de 20 m de altura. A copa é usualmente aberta e espalhada, com boa desrrama natural (BOLAND et alii<sup>06</sup>).

Segundo tais autores, esta espécie apresenta uma ampla distribuição natural no Sudeste da Austrália, incluindo a Tasmânia. A faixa de latitude varia entre 28 e 43 °S. Em termos de altitude ocorre desde o nível do mar, na parte Sul da Austrália, até 1400 m em Queensland/NSW.

Quanto às características climáticas, a espécie ocorre em clima variável de quente à frio e sub-úmido à úmido, com média da temperatura máxima do mês mais quente na faixa entre 20 e 32 °C e mínima do mês mais frio entre - 4 e 8 °C. A frequência de geadas observadas varia de 0, em regiões costeiras de baixa altitude, até mais de 100/ano em planalto de alta altitude onde pode ocorrer neve. No que se refere à precipitação atmosférica, esta apresenta uma média variável entre 500 e 2000 mm/ano (BOLAND et alii<sup>06</sup>).



Esta espécie prefere solos podzólicos arenosos ou aluviais úmidos, embora bem drenados, com subsolo argiloso. Pode ainda estar associada com diversas outras espécies de *Eucalyptus*.

## 2.2 TÉCNICAS DE CULTURA *in vitro*

A micropropagação pode ser definida como um método de propagação vegetativa baseada na multiplicação de uma planta *in vitro* (CHÉE<sup>8</sup>). O termo *in vitro* cobre uma ampla faixa de técnicas que envolvem o crescimento, sob condições assépticas, de órgãos de plantas, tais como brotações, raízes ou embriões, ou mesmo a cultura de massas de células não organizadas ou calos, células simples ou protoplastos (WILKINS et alii<sup>48</sup>).

O termo cultura de tecidos, por sua vez, é empregado erroneamente como um termo geral para descrever todos os tipos de cultura de plantas *in vitro*, quando deveria se referir estritamente à cultura daqueles agregados desorganizados de células (GEORGE & SHERRINGTON<sup>23</sup>).

Como um método de propagação vegetativa, o mesmo baseia-se na totipotência da célula vegetal, e por ser o resultado da mitose ou divisão celular, não altera a característica genética do material original (CHÉE<sup>8</sup>). Entretanto, muitos autores tem discutido sobre a dificuldade de regeneração de plantas a partir da cultura de células e calos devido à instabilidade inerente a tais sistemas e à ocorrência

de níveis variáveis de ploidias dentro das células (WILKINS et alii<sup>48</sup>). NEL<sup>41</sup> aponta a possibilidade de obtenção de plantas mutantes ou com anomalias cromossômicas utilizando-se de alguns métodos de cultivo in vitro.

As técnicas in vitro podem ser amplamente categorizadas como: cultura de órgãos, cultura de calos, cultura de suspensão de células, isolamento e cultura de células isoladas e cultura de antera e grão de pólen (WILKINS et alii<sup>48</sup>). Estes autores fazem referência sobre a utilização de algumas destas técnicas conforme o objetivo de produção de plantas.

Segundo GEORGE & SHERRINGTON<sup>23</sup>, novas plântulas podem ser obtidas sob três formas, através das técnicas de cultivo in vitro:

a) a partir de gemas pré-existentes de gemas axilares (ou gemas primárias/meristemas), as quais são estimuladas a se desenvolverem e proliferarem;

b) a partir da morfogênese de brotações, quando novas brotações são induzidas a partir de tecidos desorganizados ou diretamente de tecidos da planta mãe;

c) através da formação de embriões somáticos os quais assemelham-se com embriões de sementes, e que da mesma forma podem se desenvolver e se transformar em mudas.

Estas formas são mais comumente conhecidas respectivamente por micropropagação ou cultura de meristemas, cultura de tecidos ou calos e embriogênese somática.

### 2.3 VANTAGENS DA CULTURA DE PLANTAS IN VITRO

Vantagens e aplicações dos métodos in vitro tem sido descritos por diversos autores. Além da simples multiplicação de um genótipo desejado, os benefícios a serem alcançados com o emprego de tais métodos sobre os sistemas convencionais podem ser enormes (WILKINS et alii<sup>48</sup>). Estes autores indicam como vantagens a alta taxa de multiplicação para a clonagem de híbridos com heterose, árvores de elite ou enxertos comprovadamente superiores; a obtenção de plantas livres de vírus para uso nos programas de melhoramento; o ganho de tempo relacionado com o longo período de rotação das essências florestais; a possibilidade de obtenção de plantas haplóides para uso em programas de cruzamento; a recuperação de embriões zigóticos de cruzamentos incompatíveis; a possibilidade de se obter um método de rápida comercialização de propágulos e rápida multiplicação em qualquer época do ano independente da estação.

BONGA & DURZAN<sup>7</sup> apontam que as técnicas in vitro podem ainda ser usadas na modificação genética das árvores. Usos possíveis seriam a seleção in vitro de variantes úteis e específicos, hibridação somática através das técnicas de fusão de protoplastos na produção de linhas de híbridos intra e inter-específicos e transformação genética através da combinação de genes.

O aumento da uniformidade dos propágulos vegetativos tem sido sugerido como um importante benefício econômico da micropropagação. A eliminação da variação genética entre as

plântulas clonadas aumenta a uniformidade do material e traz a expectativa de se contornar problemas de manejo de povoamentos florestais (McKEAND & WEIR<sup>38</sup>).

As culturas de células, tecidos ou órgãos oferecem oportunidades sem paralelo para o melhoramento florestal. A alta taxa de multiplicação e a rápida clonagem de genótipos superiores, a hibridação assexual via fusão de protoplastos, a preservação de genótipos valiosos à baixas temperaturas e a seleção de genótipos tolerantes à estresses do meio tais como doenças, secas, sais ou metais pesados, através da micropropagação, podem oferecer meios econômicos de se suplementar programas de melhoramento florestal (KARNOSKY<sup>33</sup>).

A micropropagação também é reconhecida como um instrumento útil para espécies que apresentam uma propagação difícil ou demorada através dos métodos convencionais de propagação vegetativa ou para variedades de alto valor (CHÉE<sup>8</sup>).

#### 2.4 PROBLEMAS ASSOCIADOS COM AS TÉCNICAS DE CULTURA in vitro

Apesar das vantagens que o uso destas técnicas podem trazer, alguns problemas devem ser contornados para sua utilização. Entre eles a necessidade de se adequar as condições de cultivo e o meio de cultura para cada espécie ou cultivar de uma espécie (CHÉE<sup>8</sup>). Problemas adicionais de contaminação do meio com patógenos externos, principalmente ao se trabalhar com material vindo do campo, e de exsudação de produtos fenólicos no meio para algumas espécies também são

apontados (CRESSWELL & de FOSSARD<sup>9</sup>). NEL<sup>41</sup> ainda mostra a dificuldade de se propagar material coletado de árvores adultas, a possibilidade de se produzir plantas mutantes com anormalidades cromossômicas quando se deseja a propagação de clones geneticamente homogêneos, além dos custos elevados de produção como método alternativo da propagação por sementes e/ou estacas enraizadas.

Outros problemas relacionam-se com o sucesso na iniciação da cultura e dizem respeito à idade, estado fisiológico da árvore e as condições físicas da cultura, tais como temperatura, fotoperíodo e intensidade e qualidade luminosa (WILKINS et alii<sup>48</sup>). Segundo estes autores, o principal problema no estabelecimento *in vivo* de plântulas micropropagadas vem a ser a morte pela dissecação, que estaria envolvida com o tipo de folhas das plântulas produzidas por tal sistema. Investigações indicam uma quantidade reduzida de cêra epicuticular, alto volume de espaços intercelulares do mesófilo e uma resposta estomática extremamente baixa ao estresse hídrico. A causa de tal suscetibilidade estaria relacionada com uma conexão vascular incompleta entre o sistema radicular e a brotação produzida.

JELASKA & BORNMAN<sup>32</sup> sugerem a necessidade de se obter um conhecimento mais fundamental dos processos biológicos envolvidos com o crescimento, metabolismo, desenvolvimento e reprodução, para avançar na adequação da técnica.

O potencial econômico da utilização da cultura aséptica de espécies florestais está no começo do aproveitamento. No entanto, conquistas significativas já foram reali-

zadas na regeneração de plantas de algumas espécies comercialmente importantes.

## 2.5 MICROPROPAGAÇÃO DE Eucalyptus

Para diversas espécies de Eucalyptus tem-se obtido resultados experimentais que mostram ser possível a obtenção de milhares ou mesmo milhões de plantas no período de um ano, a partir de um único explante subcultivado periodicamente (MEHRA-PALTA<sup>39</sup>).

### 2.5.1 Fonte de explantes para Eucalyptus

Para os Eucalyptus, diversas partes das plantas tem servido como fonte inicial de explantes ao se empregar técnicas de cultivo in vitro.

Na obtenção de calos, diferentes explantes foram utilizados incluindo sementes, hipocótilos, raízes de mudas, segmentos de pecíolos, caules ou cascas, lâminas de folhas, brotações apicais, tecidos de lignotubers, anteras e grãos de pólen (GONÇALVES<sup>24</sup>). Segmentos de raízes e outros órgãos, e cotilédones também tem sido relatados (MARCAVILLADA & MONTALDI<sup>37</sup>; SITA<sup>45</sup>).

Na regeneração de plantas através do cultivo de órgãos in vitro, já foram utilizados explantes nodais, folhas, pecíolos, entrenós e raízes (DURAND-CRESSWELL et alii<sup>15</sup>).

Mais recentemente, IKEMORI<sup>34</sup> utilizou brotações epicórmicas de galhos adultos como fonte inicial de explantes.

PINEDO<sup>43</sup>, trabalhando com segmentos nodais de mudas de *E. citriodora* e *E. tereticornis*, obteve baixa taxa de contaminação, utilizando NaOCl à 0,5 % por 20 min, com sobrevivência dos explantes de 98,3 % e 95 % respectivamente. No entanto, BENNETT & McCOMB<sup>5</sup> obtiveram alta taxa de contaminação em segmentos nodais de *Eucalyptus viminalis*, enquanto que filamentos de estames não contaminaram.

IKEMORI<sup>34</sup>, ao trabalhar com brotações epicórmicas de ramos e brotações apicais de *E. grandis*, encontrou sobrevivência média de 40 % e 63 % respectivamente. Os resultados obtidos mostraram que explantes livres de contaminação são de difícil obtenção sem a morte do tecido por necrose, quando uma alta concentração de desinfestante é utilizada. Para a mesma espécie, DE FOSSARD & BOURNE<sup>12</sup> encontraram contaminação de 30 % para explantes provenientes de segmentos nodais, e apenas 6 % para os oriundos de gemas apicais.

Segundo BARKER et alii<sup>4</sup>, a contaminação microbiana foi grandemente reduzida quando segmentos nodais de plantas de *Eucalyptus* crescendo em casa de vegetação foram empregados como explantes. Sob tal condição, tratamento com fungicida foi um procedimento padrão na desinfestação do material antes da coleta.

## 2.5.2 Resultados alcançados na micropropagação de *Eucalyptus*

### 2.5.2.1 Aspectos relacionados com o cultivo in vitro

Estudos tem indicado a grande influência do estágio fisiológico da planta matriz quanto à regeneração de plântulas. Segundo DURAND-CRESSWELL & NITSCH<sup>14</sup>, o potencial de cada nó depende do estado fisiológico da folha no mesmo. Estes autores sugerem que as folhas devem ser de coloração variável entre verde a verde-amarelada e localizada entre o segundo terço e a parte terminal, para maior sucesso na regeneração.

Diversos estudos tem indicado que a micropropagação de plantas a partir de material adulto é mais difícil de ser obtida quando comparada com material juvenil.

BARKER et alii<sup>4</sup> advertem que os resultados experimentais obtidos com material de mudas, relativo à indução de raízes, não podem ser extrapolados para material adulto. Segundo BENNETT & McCOMB<sup>5</sup>, para *Eucalyptus marginata*, a percentagem de enraizamento de segmentos nodais ou de calos de estames de plantas adultas foi mais baixo quando comparado com explantes oriundos de mudas. Entretanto, DURAND-CRESSWELL & NITSCH<sup>14</sup> obtiveram sucesso na iniciação de raízes e formação de plantas a partir de explantes nodais de *Eucalyptus*, acima do 80% entrenó.



Para *E. citriodora* Hook, brotações múltiplas foram obtidas a partir de gemas terminais de árvores de 20 anos. A regeneração foi obtida embora as brotações tenham enraizado somente após terem sido submetidas a três subcultivos sob condições especiais de incubação (GUPTA et alii<sup>26</sup>).

A partir de meristema nodal de árvores adultas e mudas de *Eucalyptus grandis*, SANKARA & VENKATESWARA<sup>44</sup> obtiveram alta frequência de indução de brotações múltiplas com subsequente enraizamento da ordem de 60 % e 35 %, respectivamente para explantes oriundos de material juvenil e adulto.

Outro aspecto relacionado com o cultivo inicial de explantes é a exsudação fenólica dos tecidos no meio de cultura, o qual tem demonstrado ser detrimental para os mesmos. Diversos métodos de eliminação ou prevenção da formação de fenóis tem sido testados. Entre eles, a suplementação do meio de cultura com substâncias anti-oxidantes ou adsorventes, tais como carvão ativado, ácido ascórbico, cisteína e polivinilpirrolidone (PVP) (WILKINS et alii<sup>48</sup>). Entretanto, nenhuma solução definitiva foi encontrada, embora uma esterilização superficial seguida de rápida limpeza tenha minimizado o problema. De acordo ainda com estes autores, uma vez iniciada a cultura, poucos problemas tem sido encontrados no estabelecimento das condições necessárias à proliferação de brotações.

### 2.5.2.2 Cultura de calos de Eucalyptus

O primeiro relato de obtenção de plantas a partir do cultivo *in vitro* de eucaliptos foi feito por ANEJA & ATAL<sup>2</sup>, em 1969, a partir de tecido de lignotuber de *E. citriodora* Hook., após a obtenção de um calo, em meio de MURASHIGE & SKOOG suplementado com água de côco. Observou-se que a habilidade de formação de plântulas é inerente ao tecido de origem, dentro de uma mesma composição de meio de cultura e concentração de auxina.

DE FOSSARD et alii<sup>13</sup> descreveram a resposta de calos de tecidos de caule e de lignotubers de eucalipto sob várias modificações de auxina e citocinina, sem contudo obter a regeneração de plântulas. Para *Eucalyptus bancroftii* Maiden, LEE & DE FOSSARD<sup>36</sup> obtiveram calo com aparência nodular a partir de tecido de caule e de lignotubers na tentativa de induzir a regeneração. Apesar de diferenças substanciais terem sido obtidas no crescimento do calo, a regeneração contudo não ocorreu. Estes autores relatam que o melhor crescimento de calo a partir do caule ocorreu em meio suplementado com  $2,5 \times 10^{-5}M$  de ácido naftoxiacético (ANO) e  $16 \times 10^{-6}M$  de benzilaminopurina (BAP), enquanto  $2 \times 10^{-5}M$  de ácido 2,4 - diclorofenoxiacético (2,4-D) e  $2 \times 10^{-6}M$  de BAP foi a melhor combinação para calo de lignotubers.

MARCAVILLACA & MONTALDI<sup>37</sup> obtiveram calo a partir de segmento de ramos de *Eucalyptus x trabuti* Vilmorin, embora sem sucesso na diferenciação de raízes e órgãos, na presença de 10 ppm de ácido indolacético (AIA). O calo foi subculti-

vado em meio suplementado com extrato de leveduras, cinetina e AIA, tendo o melhor desenvolvimento ocorrido no escuro à 25°C.

A partir de calo de hipocótilo e cotilédone de *E. citriodora*, SITA<sup>45</sup> obteve sucesso na morfogênese e regeneração de plantas após 6 semanas de cultivo em meio de MURASHIGE & SKOOG (MS) suplementado com zeatina e ácido indolbutírico (AIB), enquanto que calos obtidos de folhas e de brotações de plantas com 1 ano de idade não se diferenciaram. Apesar do sucesso obtido, este autor indica que a morfogênese que conduz à formação de plântulas é mais difícil de se obter quando comparada com a indução e cultura do calo. De um modo geral, a alta concentração de auxina usada na indução e manutenção do calo foi inibitória para a morfogênese.

#### 2.5.2.3 Cultura de órgãos de *Eucalyptus*

Diversas espécies de *Eucalyptus* podem ser propagadas através de técnicas de cultura de órgãos. Tais técnicas vem sendo preferencialmente utilizadas em relação aos métodos tradicionais de propagação vegetativa devido às elevadas taxas de multiplicação possíveis de serem obtidas (DURAND-CRESSWELL et alii<sup>45</sup>), além de se constituir em um meio de propagação mais rápido que a cultura de tecidos.

Entre os diversos órgãos de *Eucalyptus* que já foram cultivados in vitro observa-se explantes de folhas, pecíolos, entrenós, raízes e segmentos nodais (DURAND-CRESSWELL

et alii<sup>15</sup>).

Quanto ao meio de cultura, a tentativa de BACHELARD & STOWE<sup>3</sup> em determinar o requerimento para o crescimento de raízes de *Eucalyptus camaldulensis* in vitro mostrou que, em meio suplementado com 14 % de leite de côco, as raízes cresceram vigorosamente por um período de 4 meses. Este estudo revelou ainda, que a presença de um segmento de tecido de hipocótilo junto às raízes beneficiou o crescimento destas.

Regeneração também foi obtida para o *Eucalyptus alba* Reinw., a partir de hipocótilos cultivados em meio de WHITE, suplementado com água de côco (15 % V/V) e  $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$  de AIA (KITAHARA & CALDAS<sup>35</sup>). Segmentos de hipocótilo de *E. globulus* Labill produziram brotações e raízes, com ou sem a formação de calos, em meio de SCHENK & HILDEBRANDT na presença de auxina e citocinina (OKA et alii<sup>42</sup>). Efetuando-se estudo histológico sobre a formação de brotações, estes autores encontraram que o início do processo se deu pela divisão das células epidérmicas e sub-epidérmicas, as quais formaram um tecido nodular que posteriormente se desenvolveu em brotação.

Múltiplas gemas adventícias foram induzidas a partir de cotilédones, ápices de brotação e segmentos nodais do caule de mudas de 8 meses de *Eucalyptus nova-anglica* e *Eucalyptus viminalis* (MEHRA-PALTA<sup>39</sup>). Entretanto, na regeneração de plantas, uma baixa porcentagem de enraizamento foi obtida.

DURAND-CRESSWELL et alii<sup>15</sup> relatam o desenvolvimento de plântulas a partir da cultura nodal de mudas de diversas

espécies de *Eucalyptus*. Os explantes nodais considerados foram segmentos nodais muito pequenos onde as brotações desenvolvem-se a partir de gemas axilares ou acessórias presentes na base das folhas.

Gemas de brotações foram obtidas a partir da cultura de meristema de plantas de *Eucalyptus citriodora* em meio MS suplementado com benziladenina (BA) e AIA (GREWAL et alii<sup>25</sup>). O número de gemas formadas foi significativamente reduzido quando se omitiu o BA, e o AIA foi utilizado isoladamente. A suplementação com ácido ascórbico foi essencial para a iniciação de gemas e subsequente desenvolvimento, além de prevenir a exsudação dos explantes. Ainda neste estudo, baixas concentrações de  $\text{KNO}_3$  e  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e o dobro da concentração de  $\text{CaCl}_2$  aumentaram a taxa de multiplicação das gemas favorecendo o alongamento das brotações.

Gemas axilares em explantes nodais de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus nitens* foram induzidas a desenvolver, com subsequente multiplicação em meio de BOULAY contendo alta concentração de BA em relação à ANA (FURZE & CRESSWELL<sup>21</sup>). O uso de zeatina no meio de cultura provocou a formação de grande quantidade de calo, o qual foi inibitório para o crescimento das gemas induzidas. Tais autores obtiveram sucesso na regeneração de plântulas, com enraizamento de 90 % para o *E. grandis* e 80 % para o *E. nitens*. Os explantes de *E. grandis* responderam de forma similar aos oriundos de brotações de rebrota quando em cultura.

Regeneração in vitro para *Eucalyptus gunnii* e *Eucalyptus dalrympleana* foi obtida a partir da cultura de seg-

mentos nodais de brotações jovens de clones de 2 anos de idade utilizando-se o método de DE FOSSARD na multiplicação de gemas axilares (FRANCLET & BOULAY<sup>19</sup>). Por este método, gemas foram iniciadas em meio MS, com 1/3 da concentração de cálcio, suplementado com  $1 \text{ mg.l}^{-1}$  de BAP e  $0,01 \text{ mg.l}^{-1}$  de ANA. Brotações foram subcultivadas em meio de propagação, o qual incluiu a adição de vitaminas e modificação no balanço hormonal de BAP para  $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ . O uso combinado de carvão ativado (CA) e ácido giberélico ( $\text{GA}_3$ ) no meio de cultura, permitiu o alongamento das brotações, enquanto a adição isolada destes produtos não apresentou igual sucesso. O enraizamento foi obtido em meio de KNOP suplementado com  $1 \text{ mg.l}^{-1}$  de AIB, com subsequente transferência das plântulas para casa de vegetação.

Mais recentemente, a partir de explantes nodais de *Eucalyptus viminalis* Labill, CUNNINGHAM & MOTT<sup>10</sup> obtiveram a produção de múltiplas brotações axilares *in vitro*. O genótipo da planta, a seleção do nó e o vigor da planta original influenciaram a produção de brotações axilares. Este estudo revelou ainda não haver influência da concentração de BAP ou do período de permanência das brotações em cultura sobre a indução de brotações múltiplas.

Para materiais adultos, a micropropagação tem sido de obtenção mais difícil, considerando a adequação das diferentes fases de cultivo. Adicionalmente, materiais adultos de eucaliptos apresentam maiores teores de produtos fenólicos, aumentando assim os problemas com oxidação do meio de cultura, com efeitos deletérios sobre o explante (DE FOSSARD et

alii<sup>13</sup>). Espécies como *Eucalyptus ficifolia*, *E. citriodora*, *E. grandis* e *E. dalrympleana* tem mostrado potencial limitado para a propagação *in vitro* a partir de brotações adultas (GUPTA et alii<sup>26</sup>).

#### 2.5.2.4 Taxa de multiplicação

A taxa de multiplicação, do ponto de vista da produção massal, varia entre espécies de acordo com os resultados experimentais obtidos em laboratório.

GONÇALVES<sup>24</sup> calculou uma taxa de multiplicação *in vitro* de  $7,5 \times 10^{13}$  brotações por ano para o *Eucalyptus urophylla* S.T. BLAKE. Para várias espécies de *Eucalyptus*, HARTNEY<sup>29</sup> indicou uma taxa teórica de produção de  $1,3 \times 10^8$  brotações por ano a partir de uma única brotação. Gemas induzidas de diferentes partes de mudas pré-germinadas forneceram uma estimativa de obtenção de mais de 1 milhão de brotações, produzidas a partir de uma única muda, no período de um ano (MEHRA-PALTA<sup>39</sup>).

Para *E. grandis* e *E. nitens*, FURZE & CRESSWELL<sup>21</sup> indicam a possibilidade de obtenção de 350,000 e 250,000 brotações respectivamente, a partir de um único explante nodal no período de seis meses. Entretanto, estes autores advertem que o número real de plantas obtidas seria menor devido a perdas durante o processo de enraizamento e aclimação das plântulas.

Por sua vez, GUPTA et alii<sup>26</sup> indicam a possibilidade de obtenção de 100.000 plantas por ano a partir de uma simples gema de *Eucalyptus citriodora*.

#### 2.5.2.5 Custos envolvidos

Quanto aos custos, os métodos de propagação vegetativa são, via de regra, mais caros do que a propagação pelo processo sexuada (CRESSWELL & DE FOSSARD<sup>9</sup>). Entretanto, HARTNEY<sup>28</sup>, afirma que o custo da propagação através da cultura de tecidos não é necessariamente maior do que os encontrados para a estaquia. KARNOSKY<sup>33</sup>, por outro lado, sugere que os custos de propágulos obtidos através da cultura de tecidos serão provavelmente maiores do que os custos de mudas geneticamente melhoradas.

De qualquer forma, estudos neste sentido ainda são escassos pois dependem que um sistema de propagação massal seja efetivamente estabelecido para uma real avaliação dos custos envolvidos. BONGA<sup>7</sup> considera que o emprego de técnicas de micropropagação, em programas de melhoramento florestal, poderão compensar os custos obtidos.

Análises de custos efetuadas para plântulas de coníferas micropropagadas indicam que o uso da micropropagação se tornará competitivo em relação à propagação por mudas ao se aumentar a taxa de crescimento, reduzindo a idade de rotação da nova floresta (HASNAIN & CHELIAK<sup>30</sup>).



### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 CONDIÇÕES AMBIENTAIS DAS CULTURAS

Os experimentos de isolamento do material vegetal, multiplicação, alongamento e enraizamento das brotações foram conduzidos sob um fotoperíodo de 16 h de luz e 8 h de escuro fornecido por lâmpadas fluorescentes branca-fria e "Sylvania" GRO-LUX F40/12. Os frascos foram mantidos em prateleiras à 60 cm das lâmpadas, sob intensidade luminosa de 3000 lux.

A temperatura ambiente foi mantida em torno de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  em todos os experimentos.

#### 3.2 MEIOS DE CULTURA E RECIPIENTES

O meio básico utilizado foi o de MURASHIGE & SKOOG<sup>40</sup>, com alterações na sua concentração de sais minerais, bem como suplementação, nas diferentes fases de cultura. Tal meio foi suplementado com 2 % sacarose (P/V), 0,8 % de ágar (P/V) e as vitaminas descritas por GAMBORG & WETTER<sup>22</sup>.

Em todas as fases os meios de cultura foram preparados a partir de soluções estoques autoclavadas por 20 min sob pressão constante de 1,5 atm e temperatura de  $120^{\circ}\text{C}$  em copos de Becker previamente esterilizados, com capacidade de

1. Após o preparo e antes da autoclavagem, o pH dos meios foi ajustado em 5,8 com solução 1 N de NaOH e/ou HCl.

Posteriormente os meios foram distribuídos em alíquotas de 8 ml em tubos de ensaio de 18 x 150 mm para uso nas fases de desinfestação de segmentos nodais e alongamento de brotações. Nas demais fases utilizou-se frascos individuais com capacidade aproximada de 10 ml de meio por frasco. Em todos os casos vedou-se cada recipiente com tampa de papel alumínio antes do meio ser autoclavado, o que se processou sob as mesmas condições de temperatura e pressão descritas para as soluções estoque.

### 3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento empregado foi o completamente ao acaso, para todos os experimentos efetuados, com diferentes números de tratamentos e repetições em cada fase. O número de tratamentos variou de 8 a 12 e o número de amostras por tratamento variou entre 15 a 30 explantes.

Nos diferentes ensaios realizados, os tratamentos constituíram-se de combinações fatoriais. Na fase de desinfestação do material vegetal, os tratamentos consistiram da combinação de diferentes concentrações de hipoclorito de sódio com tempo de exposição dos explantes às soluções. A fase de multiplicação consistiu de combinações de diferentes concentrações de BAP e ANA. Por sua vez, a fase de alongamento teve dois experimentos, o primeiro combinando os fatores

meio de cultura com adição suplementar de nitrogênio e regime de luz. No segundo experimento, foram utilizadas diferentes concentrações de carvão ativado, GA<sub>3</sub> e AIB. Na fase de enraizamento, os tratamentos empregaram a combinação de concentrações de sais no meio de cultura, cinetina e AIB.

### 3.4 FONTE DE EXPLANTES

A fonte de explantes utilizada na introdução do material em cultura foi 15 mudas selecionadas de *Eucalyptus viminalis* com um ano de idade, previamente estabelecidas em sacos plásticos com terra, procedentes do viveiro do Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal (atual IBAMA) de Araucária, PR. As mesmas foram mantidas podadas em telado, conservando as características juvenis da espécie, durante o período que antecedeu o início dos trabalhos de laboratório.

Sob condições de telado, as mudas receberam pulverizações semanais com fungicida BENLATE 500 (metil-1(butilcarbamoil)-2-benzimidazol carbamato) na concentração de 2  $\mu$ g. l<sup>-1</sup> por aplicação durante o mês que antecedeu a coleta dos explantes.

As brotações apicais e laterais das mesmas foram parcialmente cortadas, deixando-se cerca de 1/4 do comprimento de cada folha. Segmentos nodais com aproximadamente 1,5 cm de comprimento foram colocados em recipientes com água previamente destilada e esterilizada.

Os segmentos obtidos foram levados ao laboratório e mantidos em água corrente por uma hora, posteriormente lavados em solução com 10 % de detergente comercial (V/V) por 20 min sob agitação manual periódica e lavados em seguida em água destilada e esterilizada.

### 3.5 DESINFESTAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

Os tratamentos empregados consistiram das combinações de hipoclorito de sódio ( $\text{NaClO}$ ) nas concentrações 1 e 2 % de cloro livre com diferentes períodos de exposição às soluções (5, 10 e 15 min). Em cada tratamento adicionou-se 1 % de adesivo espalhante Tween 20 (monosorbitol) na solução de hipoclorito de sódio.

Após a imersão dos segmentos em tais soluções, procedeu-se a lavagem dos mesmos, por três vezes, em água destilada e esterilizada.

Após os tratamentos fitossanitários terem sido completados, os segmentos foram inoculados em meio MS reduzido à metade de sua concentração original e suplementado com sacarose, ágar e as vitaminas citadas no item 3.2, com o ácido naftaleno-acético (ANA) e benzilaminopurina (BAP) ambos na concentração de  $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ . Nesta fase foram utilizados 30 explantes/tratamento.

Este experimento foi acompanhado durante 3 semanas, sendo avaliado, após este período, a sobrevivência, contaminação por fungo e/ou bactéria, oxidação do meio de cultura e

número de explantes com gemas desenvolvidas, conforme os seguintes critérios:

a) contaminação: número de explantes com ocorrência de fungo e/ou bactéria;

b) oxidação: número de explantes que exsudaram produtos fenólicos no meio de cultura;

c) sobrevivência: número de explantes vivos, considerando-se vivo aquele que apresentava coloração normal do segmento nodal e sem necrose dos tecidos;

d) desenvolvimento de gemas: número de explantes com gemas axilares desenvolvidas, diferenciando-se explantes com brotações totais e brotações chamadas subcultiváveis, ou seja, aquelas que poderiam ser utilizadas nas fases subsequentes.

Explantes totalmente contaminados por fungo e/ou bactéria foram considerados mortos.

### 3.6 MULTIPLICAÇÃO DAS BROTAÇÕES

Os explantes utilizados nesta fase foram brotações subcultivadas a partir de brotações dos segmentos nodais inicialmente isolados, com altura aproximada de 0,5 cm.

Esta fase foi considerada em dois subcultivos, sendo que no primeiro os tratamentos empregados consistiram da combinação fatorial de diferentes concentrações de ANA (0; 0,1; 0,5 e 1,0 mg.l<sup>-1</sup>) com BAP (0,2; 0,5 e 1,0 mg.l<sup>-1</sup>).

No segundo subcultivo foram alteradas algumas concentrações dos reguladores de crescimento inicialmente empregados, em função de resultados obtidos no primeiro subcultivo. Os tratamentos empregados consistiram da combinação de diferentes concentrações de ANA (0; 0,5; 1,0 e 1,5 mg.l<sup>-1</sup>) com BAP (0; 0,05 e 0,1 mg.l<sup>-1</sup>).

No primeiro e segundo subcultivos utilizaram-se respectivamente 20 e 15 explantes/tratamento.

As culturas foram avaliadas após oito semanas de incubação com relação ao número de brotações multiplicadas por explante e observações visuais quanto ao aspecto das brotações obtidas, conforme descrição abaixo. A taxa de multiplicação foi obtida com base no número de brotações aproveitáveis/explante. Considerou-se como aproveitáveis as brotações com altura superior à 0,5 cm, que pudessem ser subcultivadas. Uma vez que alguns explantes originaram somente gemas múltiplas, as quais não puderam ser aproveitadas devido ao tamanho reduzido, as mesmas não foram consideradas como aproveitáveis.

O aspecto das brotações foi avaliado segundo os seguintes critérios, nos dois subcultivos:

a) altura: classificação da altura das brotações multiplicadas conforme tipo 1 (<0,5 cm), tipo 2 (entre 0,5 e 1,5 cm) ou tipo 3 (acima de 1,5 cm);

b) tipicidade: classificação do aspecto das brotações, considerando-se como típicas aquelas com gemas e folhas diferenciadas com morfologia padrão da espécie (folhas finas, alongadas e sem pecíolo, dispostas em verticilos bem

definidos e hastes finas das brotações).

### 3.7 ALONGAMENTO DAS BROTAÇÕES

Foram estabelecidos dois experimentos diferentes, visando a obtenção de brotações alongadas o suficiente e em quantidade para subsequente enraizamento.

Em ambos experimentos utilizou-se como explantes brotações com aproximadamente 0,5 cm de altura, obtidas da fase de multiplicação.

No primeiro experimento os tratamentos consistiram da combinação de fatores envolvidos com o meio de cultura (concentração de sais minerais e adição suplementar de nitrogênio) com condição de luz. O meio empregado foi o MS com a concentração integral dos sais minerais ou reduzida à metade (MS/2) suplementado ou não com nitrogênio (suplementação de  $20,61 \text{ mmol.l}^{-1}$  de  $\text{N-NH}_4$ ), sendo as culturas mantidas na presença ou ausência de luz (3000 lux) durante as duas semanas iniciais de incubação. Ao final deste período, todas as culturas foram mantidas em ambiente com fotoperíodo de 16 h de luz/8 h de escuro. Em cada tratamento foram utilizados 20 explantes.

No segundo experimento, os tratamentos consistiram da combinação do ácido giberélico ( $\text{GA}_3$ ) nas concentrações 0; 0,1 e  $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$ , com carvão ativado (C.A.) nas concentrações 0 e  $15 \text{ g.l}^{-1}$  e com ácido indolbutírico (AIB) nas concentrações 0 e  $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ . O meio utilizado foi o meio básico

MS com os suplementos descritos no item 3.1, com 18 explantes/tratamento.

As culturas foram avaliadas após a quarta semana de incubação com relação à altura das brotações.

### 3.8 ENRAIZAMENTO DAS BROTAÇÕES

As brotações utilizadas como explantes nesta fase apresentavam altura variável entre 1 e 2 cm e foram provenientes de brotações alongadas no meio de multiplicação.

Os tratamentos consistiram da combinação de três fatores: concentração de sais no meio de cultura, auxina e cinetina. O meio empregado foi o MS com a concentração integral dos sais minerais ou reduzida à metade (MS/2), combinados com AIB nas concentrações 0,1; 0,5 e 1,0 mg.l<sup>-1</sup> e cinetina (KIN) nas concentrações 0 e 0,1 mg.l<sup>-1</sup>. A cinetina foi utilizada em função de resultados de testes prévios efetuados, onde se detectou efeito favorável deste regulador de crescimento sobre o enraizamento de brotações de *Eucalyptus viminalis* quando em cultura. Em cada tratamento empregaram-se 18 explantes.

Os tratamentos foram avaliados após a quarta semana de incubação com relação ao número de brotações que enraizaram e o aspecto das brotações ou plântulas obtidas. Neste caso os critérios utilizados foram:



a) calosidade na base: pequena, média ou excessiva;

b) alongamento das brotações: número de brotações que apresentaram-se, alongadas.

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

##### 4.1 DESINFESTAÇÃO DO MATERIAL

Os resultados da análise binomial efetuada para os dados de desinfestação dos segmentos nodais encontram-se relacionados na tabela 1.

O tratamento que apresentou o melhor efeito sobre a desinfestação dos explantes foi o 2, que combinou o uso de hipoclorito de sódio à 1 % de cloro livre por 10 minutos de exposição dos explantes à solução, não tendo sido observada nenhuma contaminação nos mesmos.

Embora no tratamento 3 um total de 93,3 % dos explantes tenham sobrevivido, observou-se neste tratamento uma das maiores taxas de oxidação do meio, em comparação com os demais.

De um modo geral, o tratamento menos eficaz para a desinfestação do material foi o que utilizou hipoclorito de sódio à 2 % por 15 min, o qual apresentou as menores percentagens de sobrevivência dos explantes e gemas desenvolvidas. Isto pode estar relacionado com a maior oxidação do meio de cultura, observada neste tratamento.

Experimento similar realizado em outra época do ano, no qual não se efetuou controle fitossanitário nas mudas do telado antes da coleta dos explantes, mostrou uma maior mortalidade e contaminação dos mesmos em relação a este experimento. Isto pode ser um indicativo da importância da época

TABELA 1. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE HIPOCLORITO DE SÓDIO E PERÍODO DE EXPOSIÇÃO NA DESINFESTAÇÃO DE EXPLANTES NODAIS DE *Eucalyptus viminalis*, APÓS QUATRO SEMANAS DE INCUBAÇÃO

TRAT.	NaClO (%)	PERÍODO EXP. (min)	SOBRE- VIVÊNCIA	CONTA- MINAÇÃO (% $\pm$ s) <sup>2</sup>	OXIDAÇÃO
1.	1,0	5	66,6 $\pm$ 8,6	33,3 $\pm$ 8,6	20,0 $\pm$ 7,3
2.	1,0	10	100,0 -	0,0 -	20,0 $\pm$ 7,3
3.	1,0	15	93,3 $\pm$ 4,5	3,3 $\pm$ 3,2	43,3 $\pm$ 9,0
4.	2,0	5	73,3 $\pm$ 8,1	26,6 $\pm$ 8,0	23,3 $\pm$ 7,7
5.	2,0	10	76,6 $\pm$ 7,7	6,6 $\pm$ 4,5	23,3 $\pm$ 7,7
6.	2,0	15	43,3 $\pm$ 9,0	13,3 $\pm$ 6,2	43,3 $\pm$ 9,0

<sup>2</sup>s indica o desvio padrão obtido através da análise binomial.

$$s = \sqrt{p \cdot q / n}$$

do ano e do estado fisiológico da planta por ocasião da coleta e isolamento dos segmentos nodais. A manutenção das plantas com aplicação periódica de fungicida, irrigação frequente somente na base das mesmas e a utilização apenas das brotações crescidas sob condições controladas, parece ser de grande importância no sucesso do estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de mudas de *Eucalyptus viminalis*.

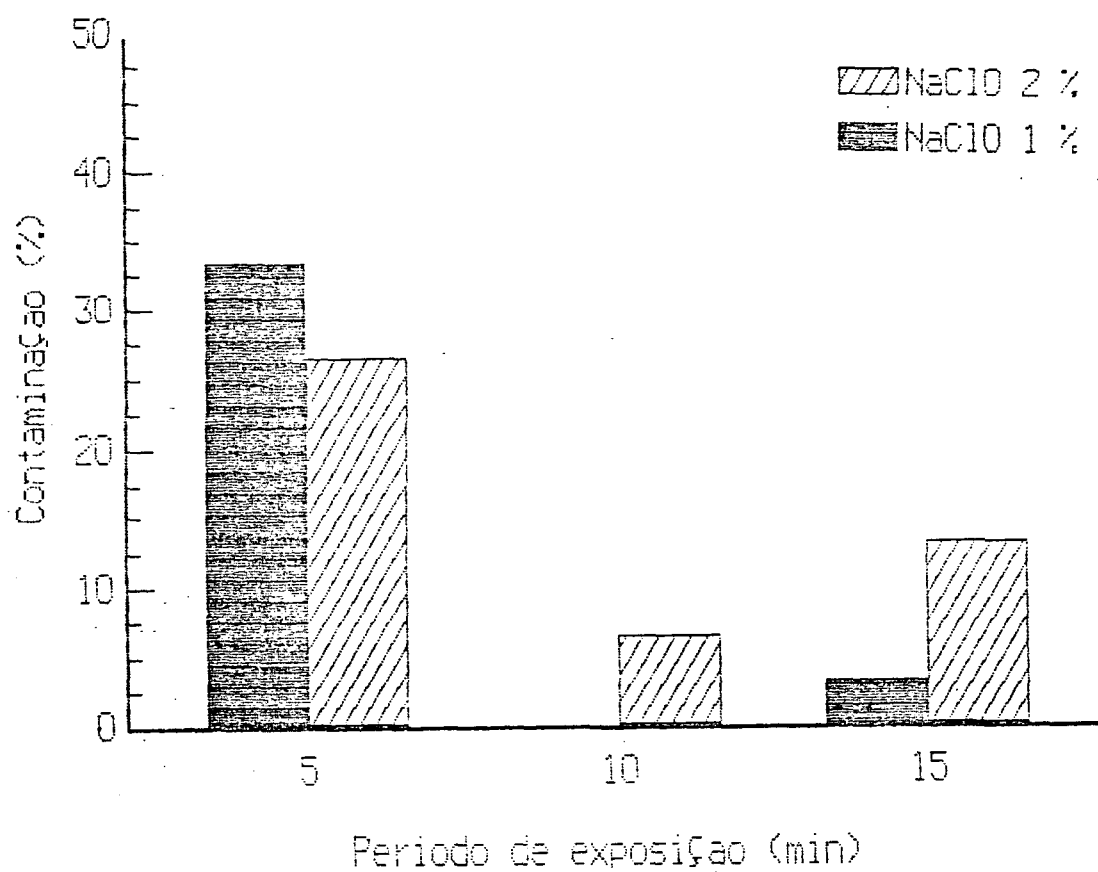
#### 4.1.1 Contaminação

O tratamento 2 foi o melhor tratamento quanto à contaminação dos explantes, comparativamente com os demais, sendo que 100 % dos mesmos não contaminaram (Tabela 1). Entretanto, a ausência de contaminação dos explantes pode estar parcialmente relacionada com as práticas de desinfestação efetuadas no telado antes do isolamento.

Quando se utilizou 1 % de hipoclorito de sódio durante 5 min de exposição verificou-se a maior taxa de contaminação. Observou-se tendência geral de redução na contaminação do material em cultura ao se comparar 5 min com os demais períodos de exposição (Figura 1).

Entretanto, não se observou tendência geral de redução da taxa de contaminação ao se aumentar a concentração de hipoclorito de sódio, conforme era de se esperar. Ao contrário, verificou-se um pequeno aumento da contaminação total ao se elevar tal concentração de 10 para 15 min de exposição.

FIGURA 1. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE HIPOCLORITO DE SÓDIO E PERÍODO DE EXPOSIÇÃO SOBRE A CONTAMINAÇÃO DE EXPLANTES NODAIS DE *Eucalyptus viminalis*, APÓS QUATRO SEMANAS DE INCUBAÇÃO



#### 4.1.2 Oxidação

Os tratamentos onde houve a menor percentagem de oxidação do meio de cultura foram os tratamentos 1 e 2 que combinaram o uso de 1 % de hipoclorito de sódio por 5 e 10 min, ambos apresentando 20 % dos explantes oxidados (Tabela 1). Na sequência, os tratamentos com 2 % deste produto pelo mesmo tempo de exposição apresentaram percentagem de 23,3 % de oxidação.

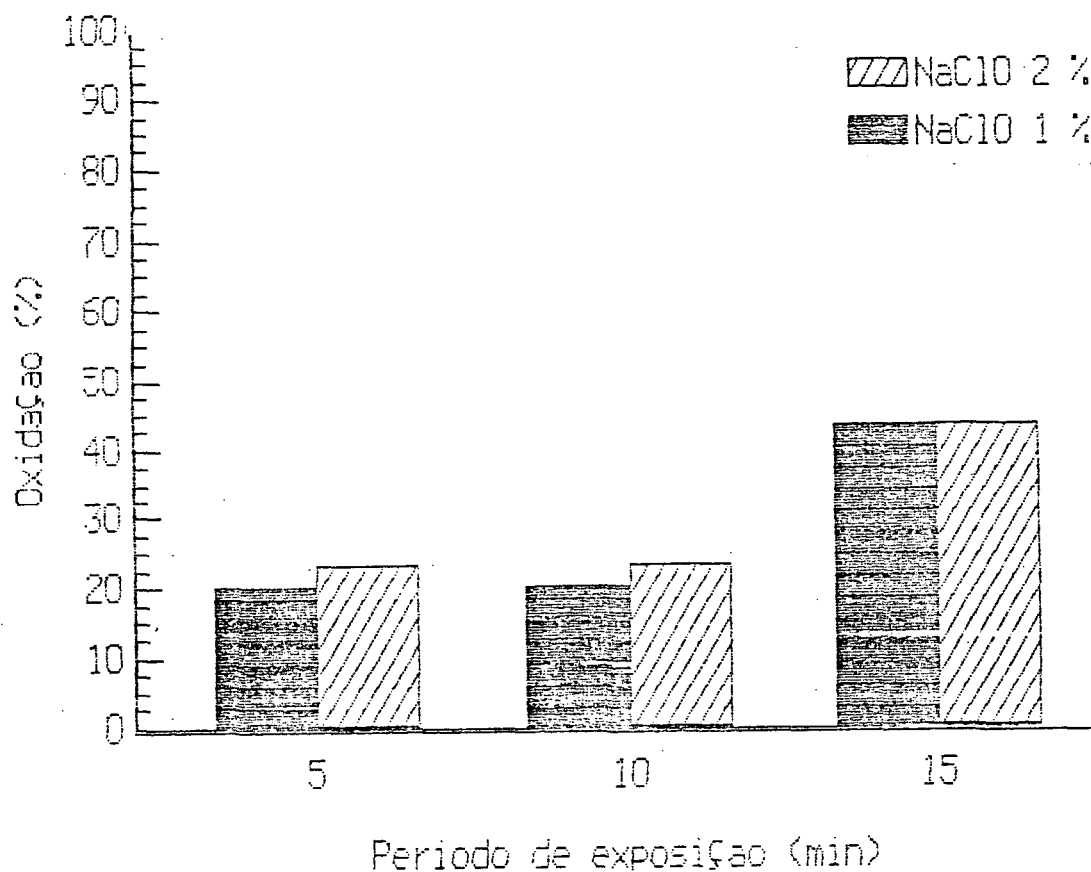
O tempo de exposição mostrou ter maior influência que a concentração de NaClO sobre a oxidação do meio de cultura (Figura 2). Não se observou diferença na taxa de oxidação ao se elevar o tempo de 5 para 10 min, independente da concentração do produto utilizado. Entretanto, para tempo de exposição de 15 min, a oxidação observada foi maior.

Segundo PINEDO<sup>42</sup>, é possível que exista uma maior penetração de hipoclorito de sódio nos tecidos vegetais, conforme aumento no tempo de exposição, o que promoveria maior liberação de fenóis por parte dos tecidos, provocando a oxidação.

#### 4.1.3 Sobrevivência

Da mesma forma que para contaminação, o uso de hipoclorito de sódio à 1 % por 10 min foi o melhor tratamento para a sobrevivência dos explantes quando comparado com os demais (Figura 3).

FIGURA 2. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE HIPOCLORITO DE SÓDIO E PERÍODO DE EXPOSIÇÃO SOBRE A OXIDAÇÃO DE EXPLANTES NODAIS DE *Eucalyptus viminalis*, APÓS QUATRO SEMANAS DE INCUBAÇÃO



O tratamento menos eficaz foi o que combinou o uso de hipoclorito de sódio à 2 % por 15 min, no qual sobreviveram apenas 43,3 % dos explantes. Possivelmente isto poderia estar relacionado com a oxidação dos tecidos dos explantes, os quais uma vez oxidados teriam sua capacidade de desenvolvimento de gemas reduzida.

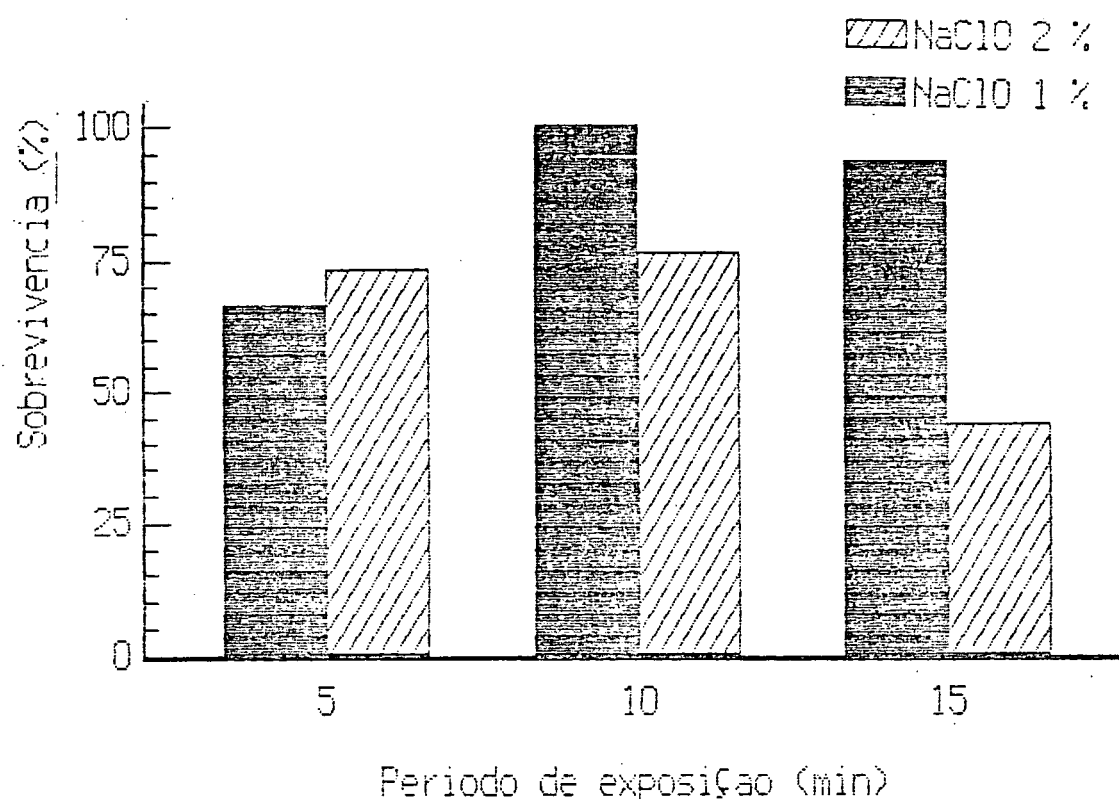
Por outro lado, menor período de exposição (5 min) foi igualmente prejudicial à sobrevivência considerando a alta taxa de contaminação encontrada. No caso de excessiva contaminação por fungo, o explante não sobreviveu por tornar-se completamente coberto pelo mesmo.

Para 5 min de exposição dos explantes à solução, não se verificou diferença, quanto à sobrevivência, entre o uso de hipoclorito de sódio à 1 ou 2 %. Entretanto para 10 e 15 min esta diferença foi observada, sendo que à 1 % obteve-se as maiores percentagens de sobrevivência (Figura 3). Nas duas concentrações de hipoclorito de sódio testadas, verificou-se uma tendência de aumento na sobrevivência ao se aumentar o período de exposição de 5 para 10 min. Entretanto, esta tendência inverteu-se ao se passar de 10 para 15 min de exposição.

De acordo ainda com a Figura 3 observou-se que para maiores períodos de exposição (10 e 15 min) existe uma tendência geral de redução da sobrevivência dos explantes a medida em que se aumenta a concentração de hipoclorito de sódio na solução. Isto pode estar relacionado com a maior penetração do NaClO sobre os tecidos dos explantes, a medida em que os mesmos sejam expostos à uma solução mais concen-



FIGURA 3. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE HIPOCLORITO DE SÓDIO E PERÍODO DE EXPOSIÇÃO SOBRE A SOBREVIVÊNCIA DE EXPLANTES NODAIS DE *Eucalyptus viminalis* APÓS, QUATRO SEMANAS DE INCUBAÇÃO



trada do produto por um maior período de tempo.

Para o desenvolvimento de gemas nos explantes, os resultados indicam o tratamento 2, que combinou o uso de 1% de hipoclorito de sódio por 10 min, como o melhor, com um total de 76,6 % dos explantes com brotações (Tabela 2). Na sequência observa-se os tratamentos 3 e 4, ambos com percentagem de 56,6 %.

Houve decréscimo no número de explantes com brotações ao se aumentar a concentração de hipoclorito de sódio de 1% para 2 %, nos tempos de 10 ou 15 min (Figura 4). Neste caso, aos 10 min houve uma redução no número de gemas desenvolvidas de 76,6 % para 40 %, ao se aumentar a concentração do produto. Aos 15 min a redução foi de 56,6 % para 13,3 %, respectivamente para 1 e 2 %. Esta tendência foi observada igualmente para a sobrevivência dos explantes (Figura 3). Maiores taxas de sobrevivência permitiram a obtenção de um maior número de explantes com gemas desenvolvidas.

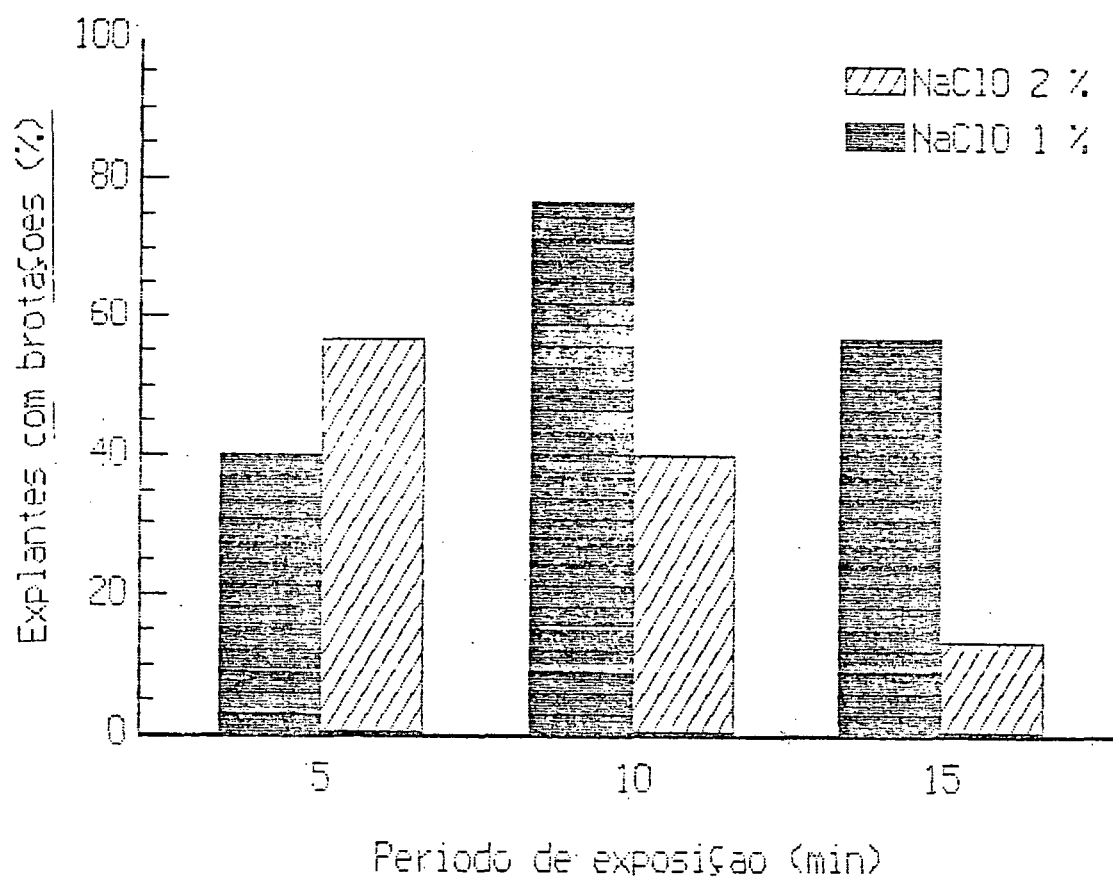
Observações visuais indicam o tratamento 2 como sendo o melhor quanto à qualidade e vigor das gemas desenvolvidas para a fase subsequente de multiplicação (Tabela 2). Verificou-se um efeito prejudicial da exposição dos explantes por 15 min à 2 % de NaClO quanto à qualidade e desenvolvimento das brotações para uso posterior. Sob tais condições, nenhuma brotação pôde ser subcultivada.

TABELA 2. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE HIPOCLORITO DE SÓDIO E PERÍODO DE EXPOSIÇÃO SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE GEMAS EM EXPLANTES NODAIS DE *Eucalyptus viminalis*, APÓS QUATRO SEMANAS DE INCUBAÇÃO

TRAT.	NaOCl (%)	PERÍODO EXP. (min)	GEMAS	EXPL. C/ BROT.
			DESENVOLVIDAS -----(% $\pm$ s) <sup>z</sup> -----	SUBCULTIV. -----
1	1,0	5	40,0 $\pm$ 8,9	30,0 $\pm$ 7,7
2.	1,0	10	76,6 $\pm$ 7,7	66,6 $\pm$ 8,5
3.	1,0	15	56,6 $\pm$ 9,1	36,6 $\pm$ 8,7
4.	2,0	5	56,6 $\pm$ 9,1	46,6 $\pm$ 9,1
5.	2,0	10	40,0 $\pm$ 8,9	26,6 $\pm$ 8,0
6.	2,0	15	13,3 $\pm$ 6,2	0,0 -

<sup>z</sup>s indica o desvio padrão obtido através da análise binomial

FIGURA 4. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE HIPOCLORITO DE SÓDIO E PERÍODO DE EXPOSIÇÃO SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE GEMAS EM EXPLANTES NODAIS DE *Eucalyptus viminalis*, APÓS QUATRO SEMANAS DE INCUBAÇÃO



## 4.2 MULTIPLICAÇÃO DAS BROTAÇÕES

### 4.2.1 Subcultivo 1 de Multiplicação

#### 4.2.1.1 Brotações multiplicadas

A análise de variância mostrou uma significância de 2,4 % para o fator BAP e de 5,9 % para o fator ANA, quanto ao número de brotações multiplicadas por explante. Entretanto, não se observou interação entre tais fatores (Anexo 1).

Neste experimento os tratamentos que resultaram nas maiores taxas de multiplicação foram os que combinaram o uso de  $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$  de BAP com  $0,5$  ou  $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$  de ANA, ambos com média de 5 brotações multiplicadas/explante (Tabela 3). Na sequência, os tratamentos com  $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$  de BAP +  $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$  de ANA e  $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$  de BAP +  $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$  de ANA permitiram a obtenção de 4,6 e 4,5 brotações/explante, respectivamente.

A análise do fator ANA indicou a existência de diferença significativa, pelo teste de Tukey efetuado, para as médias de número de brotações multiplicadas por explante entre as concentrações utilizadas (Tabela 3).

Observou-se tendência geral de aumento na taxa de multiplicação das brotações associado com o aumento da concentração de ANA de 0 para  $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$ , sendo que este comportamento foi tanto melhor quanto menor a concentração de

TABELA 3. EFEITO COMBINADO DAS CONCENTRAÇÕES DE BAP E ANA NA MULTIPLICAÇÃO DE BROTAÇÕES DE *Eucalyptus viminalis* APÓS OITO SEMANAS DE INCUBAÇÃO (SUBCULTIVO 1)

BAP (mg.l <sup>-1</sup> )	TAXA DE MULTIPLICAÇÃO <sup>2</sup>				Médias <sup>3</sup>
	ANA (mg.l <sup>-1</sup> ) 0,0	0,2	0,5	1,0	
0,2	3,0	4,6	5,0	5,0	4,4 a
0,5	2,8	3,6	3,8	4,5	3,7 ab
1,0	2,3	2,7	2,3	3,4	2,7 b
Média	2,7 b	3,6 ab	3,7 ab	4,3 a	

<sup>2</sup>número de brotações por explante

<sup>3</sup>médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

BAP ( $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$ )(Figura 5). O fato de concentrações mais elevadas de ANA terem favorecido o aumento no número de brotações multiplicadas e aproveitáveis, pode estar relacionado com a ação deste regulador de crescimento. Por se tratar de uma auxina, o qual relaciona-se com o alongamento celular, doses mais elevadas de ANA podem ter favorecido que um número maior de brotações tenham se alongado em cultura, permitindo que um maior número de brotações pudessem ser segmentadas e subcultivadas. Observações visuais atestam um grande número de brotações alongadas nos tratamentos que empregaram maiores concentrações de ANA.

Analisando-se o fator BAP verificou-se a existência de diferenças entre as médias do número de brotações multiplicadas/explante, dentro das concentrações utilizadas. Quanto menor a concentração deste regulador de crescimento, maior foi a taxa de multiplicação obtida, independente da concentração de ANA utilizada (Figura 6). Concentrações mais elevadas de BAP, como  $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$ , mostraram-se inibitórias para a multiplicação da espécie. Embora tenha-se observado multiplicação dos explantes nesta concentração, o número de brotações aproveitáveis foi significativamente menor que o obtido com o uso de  $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$  de BAP. Os resultados deste estudo não concordam com os obtidos por CUNNINGHAM & MOTT<sup>10</sup>, os quais não verificaram influência da concentração de BAP sobre a indução múltipla de brotações.

Observa-se que o *Eucalyptus viminalis* vem a ser uma espécie pouco exigente quanto à citocinina no meio de cultura, para a multiplicação de brotações. Para o E.

FIGURA 5. EFEITO DAS CONCENTRAÇÕES DE BAP, DENTRO DO FATOR ANA, SOBRE A MULTIPLICAÇÃO DE *Eucalyptus viminalis*, APÓS OITO SEMANAS DE INCUBAÇÃO (SUBCULTIVO 1)

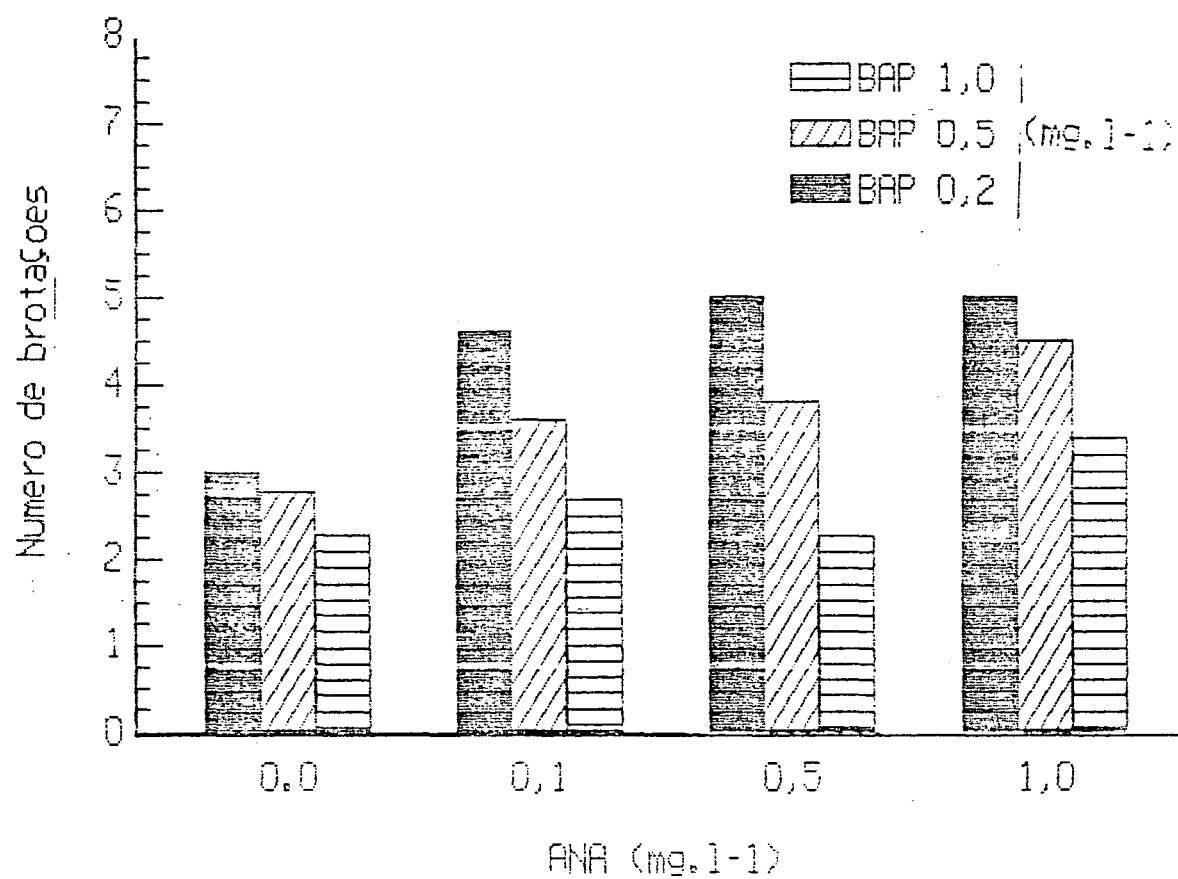
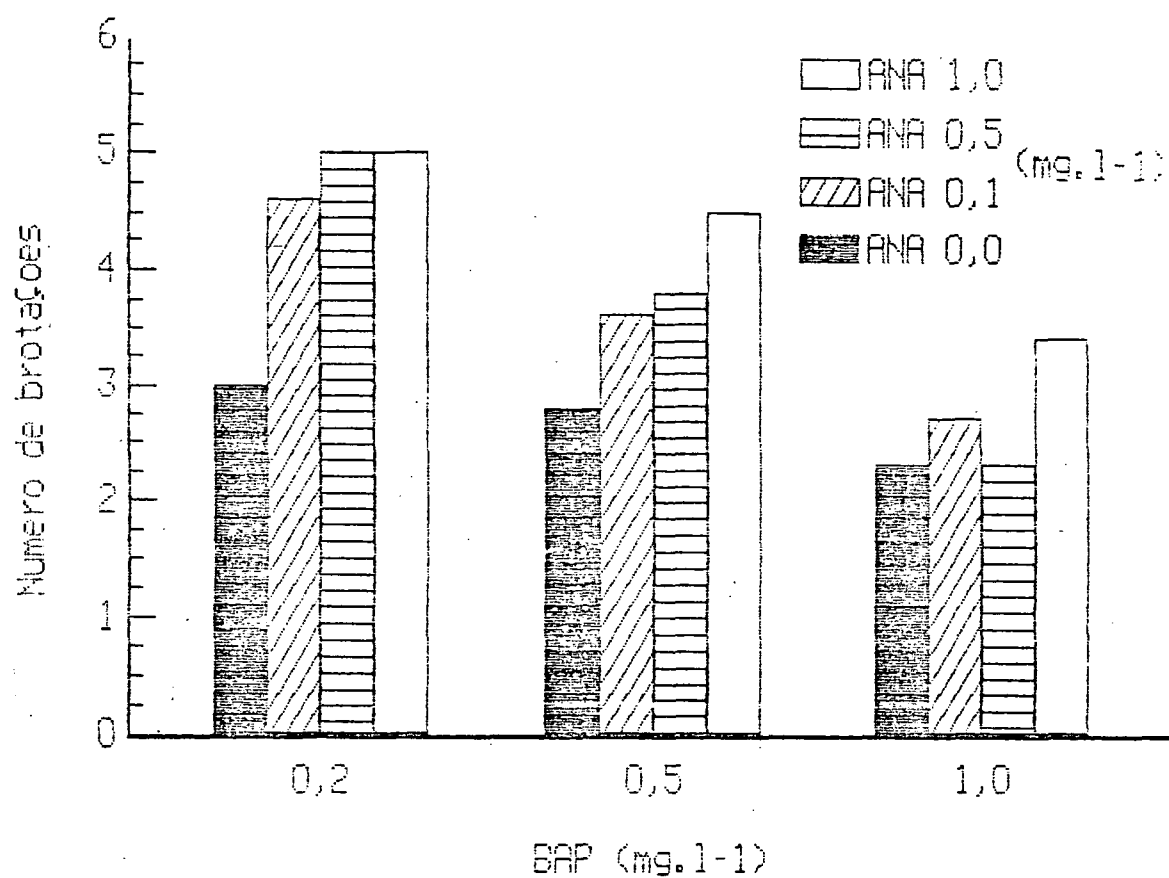




FIGURA 6. EFEITO DAS CONCENTRAÇÕES DE ANA, DENTRO DO FATOR BAP, SOBRE A MULTIPLICAÇÃO DE *Eucalyptus viminalis*, APÓS OITO SEMANAS DE INCUBAÇÃO (SUBCULTIVO 1)



*urophylla* por exemplo, GONÇALVES<sup>24</sup> obteve multiplicação na presença de  $2,0 \text{ mg.l}^{-1}$  de BAP.

#### 4.2.1.2 Aspecto das brotações

Embora os meios com  $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$  de BAP +  $0,5$  ou  $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$  de ANA tenham fornecido a maior taxa de multiplicação dos explantes, o mesmo não se verificou, de um modo geral, para o aspecto das brotações obtidas (Tabela 4). Brotações com melhor aspecto puderam ser obtidas na presença de  $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$  de BAP e  $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$  de ANA.

Concentrações mais elevadas de BAP mostraram-se prejudiciais para a qualidade das brotações. Sob tais condições verificou-se um maior número de brotações com tamanho reduzido (Altura 1) e atípicas com folhas túrgidas, arredondadas e entumescidas, gemas múltiplas não desenvolvidas e ocorrência de gemas no ápice de hastes espessas.

O tratamento que aliou as características de maior número de brotações multiplicadas/explante com melhores características morfológicas das brotações foi o uso de  $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$  de BAP com  $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$  de ANA, com média de 4,6 brotações multiplicadas/explante.

Os resultados obtidos indicam uma reduzida taxa de multiplicação para o *Eucalyptus viminalis*, quando comparada com as obtidas para outras espécies. Para o *Eucalyptus urophylla*, GONÇALVES<sup>24</sup> obteve uma taxa de multiplicação de 9-11 brotações isoladas/brotação inoculada durante a segunda

TABELA 4. EFEITO DA COMBINAÇÃO DE BAP E ANA SOBRE O ASPECTO DAS BROTAÇÕES MULTIPLICADAS DE *Eucalyptus viminalis*, APÓS OITO SEMANAS DE INCUBAÇÃO (SUBCULTIVO 1)

TRATAMENTOS		ASPECTO DAS BROTAÇÕES					
ANA (mg.l <sup>-1</sup> )	BAP	ALTURA <sup>y</sup> (%)			BROTAÇÕES (%±s) <sup>z</sup>		
		1	2	3	TIP.	ATIP.	
1.	0 x 0,2	47,4	52,6	0	47,4	52,6	±11,4
2.	0 x 0,5	63,2	31,6	5,2	47,4	52,6	±11,4
3.	0 x 1,0	73,4	21,6	0	26,3	73,7	±10,1
4.	0,1 x 0,2	11,1	61,1	27,8	66,7	33,3	±11,1
5.	0,1 x 0,5	73,7	21,1	5,2	11,5	89,5	± 7,0
6.	0,1 x 1,0	80,0	20,0	0	40,0	60,0	±10,9
7.	0,5 x 0,2	30,0	40,0	30,0	45,0	55,0	±11,1
8.	0,5 x 0,5	25,0	55,0	20,0	45,0	55,0	±11,1
9.	0,5 x 1,0	65,0	30,0	5,0	5,0	95,0	± 4,8
10.	1,0 x 0,2	42,1	31,6	26,3	73,7	26,3	±10,1
11.	1,0 x 0,5	42,1	31,6	26,3	52,7	47,3	±11,4
12.	1,0 x 1,0	35,0	50,0	15,0	20,0	80,0	± 8,9

<sup>z</sup>s indica o desvio padrão obtido através da análise binomial.

<sup>y</sup> Altura 1 (<0,5 cm)

Altura 2 (0,5 a 1,0 cm)

Altura 3 (>1,0 cm)

transferência. SANKARA & VENKATESWARA<sup>44</sup> encontraram taxa de 8-9 brotações diferenciadas para explantes de meristema nodal de *Eucalyptus grandis*. Maiores taxas de propagação, como de 30 brotações/explante foram obtidas para *Eucalyptus gunnii* e *Eucalyptus dalrympleana* (FRANCLET & BOULAY<sup>19</sup>).

Os resultados obtidos neste estudo confirmam a baixa taxa de multiplicação encontrada por CUNNINGHAM & MOTT<sup>10</sup> para o *Eucalyptus viminalis*, os quais encontraram um máximo de 2,9 brotações/explante em meio suplementado com 0,2 mg.l<sup>-1</sup> de BAP e 0,01 mg.l<sup>-1</sup> de ANA, após 3 semanas de incubação.

Em função da tendência de aumento da taxa de multiplicação conforme redução da concentração de BAP no meio, foi efetuado outro experimento visando identificar o efeito de concentrações de BAP inferiores a 0,2 mg.l<sup>-1</sup> sobre a multiplicação da espécie.

#### 4.2.2 Subcultivo 2 de Multiplicação

##### 4.2.2.1 Brotações multiplicadas

Neste segundo subcultivo, o tratamento que propiciou a maior taxa de multiplicação de brotações foi o que combinou o uso de 0,1 mg.l<sup>-1</sup> de BAP com 0,5 mg.l<sup>-1</sup> de ANA, com média de 6,2 brotações multiplicadas/explante (Tabela 5). Adicionalmente os tratamentos com 1,0 e 0 mg.l<sup>-1</sup> de ANA com a mesma concentração de BAP forneceram respectivamente 5,2

TABELA 5. EFEITO COMBINADO DA CONCENTRAÇÃO DE BAP E ANA NA MULTIPLICAÇÃO DE BROTAÇÕES DE *Eucalyptus viminalis* APÓS OITO SEMANAS DE INCUBAÇÃO (SUBCULTIVO 2)

BAP (mg.l <sup>-1</sup> )	TAXA DE MULTIPLICAÇÃO <sup>Z</sup>				Médias <sup>Y</sup>
	ANA(mg.l <sup>-1</sup> )				
	0,0	0,5	1,0	1,5	
0,0	2,0	2,8	2,4	2,5	2,4 b
0,05	4,4	4,9	3,8	4,0	4,3 a
0,1	5,1	6,2	5,2	4,3	5,2 a
Média	3,8 a	4,6 a	3,8 a	3,6 a	

<sup>Z</sup>número de brotações por explante.

<sup>Y</sup>médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

e 5,1 brotações/explante.

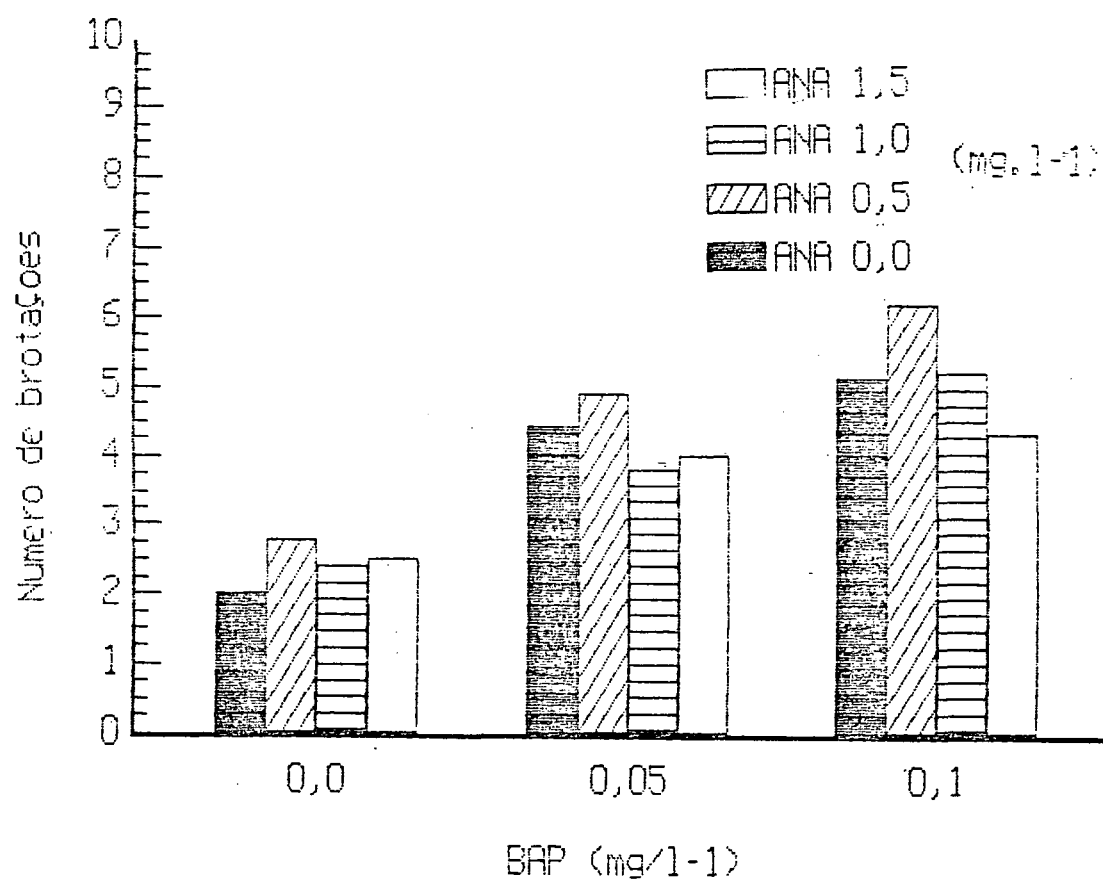
Resultados da análise de variância mostraram significância dentro de BAP, não se observando, como na subcultura 1, para ANA ou entre a combinação destes reguladores de crescimento (Anexo 2).

Conforme encontrado no primeiro experimento, os resultados obtidos indicam um número máximo de 5 a 6 brotações multiplicadas/explante para *Eucalyptus viminalis*, em cada subcultivo.

Considerando o fator BAP, os resultados mostram a existência de diferença significativa para as médias de número de brotações multiplicadas/explante dentro das concentrações utilizadas (Tabela 5). A ausência de BAP no meio de cultura foi prejudicial para a multiplicação ao se comparar com o uso de 0,05 e 0,1 mg.l<sup>-1</sup> deste regulador de crescimento.

De acordo com a figura 7 observa-se tendência de aumento na multiplicação associado com aumento da concentração de BAP de 0 para 0,1 mg.l<sup>-1</sup>, dentro da faixa de concentração de ANA utilizada. Este comportamento foi melhor ao se utilizar 0,5 mg.l<sup>-1</sup> de ANA. Analisando-se os resultados dos dois subcultivos, embora sejam experimentos distintos, observou-se aumento na taxa de multiplicação conforme aumento nas concentrações de BAP de 0 para 0,1 mg.l<sup>-1</sup> (subcultivo 2) e subsequente decréscimo nesta taxa conforme aumento nas concentrações de BAP de 0,2 para 1,0 mg.l<sup>-1</sup> (subcultivo 1). A tendência indicada no primeiro subcultivo de aumento da taxa de multiplicação conforme diminuição da concentração de BAP

FIGURA 7. EFEITO DAS CONCENTRAÇÕES DE ANA, DENTRO DO FATOR BAP, SOBRE A MULTIPLICAÇÃO DE *Eucalyptus viminalis*, APÓS OITO SEMANAS DE INCUBAÇÃO (SUBCULTIVO 2)



não se verificou para concentrações menores que  $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ . Portanto, a faixa de concentração de BAP associada com a obtenção de maior número de brotações multiplicadas parece estar situada entre  $0,1$  e  $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$ .

As médias encontradas para a multiplicação não foram afetadas pelo uso do ANA, independente da concentração utilizada (Tabela 5). Entretanto observou-se tendência de aumento na taxa de multiplicação associado com aumento da concentração de ANA de  $0$  para  $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$  com subsequente redução para concentrações maiores deste fator, como  $1,0$  e  $1,5 \text{ mg.l}^{-1}$ , dentro da faixa de concentração utilizada (Figura 8). Este comportamento foi tanto melhor quanto maior a concentração de BAP, até a maior concentração testada, no caso  $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ .

#### 4.2.2.2 Aspecto das brotações

Observações quanto ao aspecto das brotações indicaram que a ausência do fator BAP no meio de cultura foi prejudicial para a qualidade das brotações obtidas. Neste caso, encontrou-se maior número de brotações com altura reduzida ( $<0,5 \text{ cm}$ ), que não puderam ser aproveitadas em subcultivos posteriores (Tabela 6). As melhores brotações foram obtidas na presença de  $0,0$ ;  $0,5$  ou  $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$  de ANA, embora com deficiências.

As brotações nesta fase apresentaram aspecto mais atípico das brotações da espécie, em relação ao experimento



FIGURA 8. EFEITO DAS CONCENTRAÇÕES DE BAP, DENTRO DO FATOR ANA, SOBRE A MULTIPLICAÇÃO DE *Eucalyptus viminalis*, APÓS OITO SEMANAS DE INCUBAÇÃO (SUBCULTIVO 2)

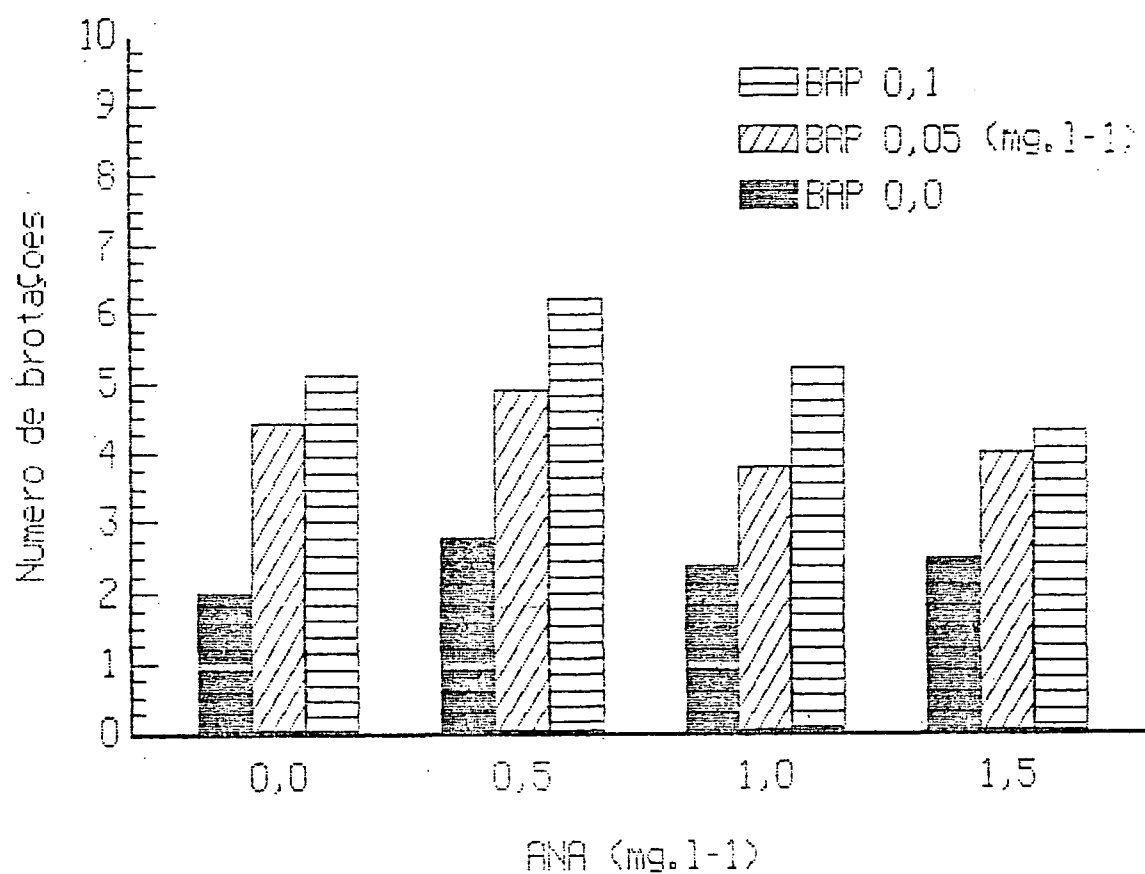


TABELA 6. EFEITO DA COMBINAÇÃO DE BAP E ANA SOBRE O ASPECTO DAS BROTAÇÕES MULTIPLICADAS DE *Eucalyptus viminalis*, APÓS OITO SEMANAS DE INCUBAÇÃO (SUBCULTIVO 2)

TRATAMENTOS		ASPECTO DAS BROTAÇÕES					
ANA	BAP	ALTURAS <sup>3</sup> (%)			BROTAÇÕES (% $\pm$ s) <sup>2</sup>		
(mg.l <sup>-1</sup> )		1	2	3	TIP.	ATIP.	
1.	0 x 0	83,3	16,7	0	16,6	83,4	$\pm 10,7$
2.	0 x 0,05	17,5	71,4	11,1	26,7	73,3	$\pm 11,4$
3.	0 x 0,1	15,6	73,3	11,1	26,7	73,3	$\pm 11,4$
4.	0,5 x 0	60,0	40,0	0	35,7	64,3	$\pm 12,8$
5.	0,5 x 0,05	15,6	73,3	11,1	21,4	78,6	$\pm 10,9$
6.	0,5 x 0,1	24,5	53,3	22,2	20,0	80,0	$\pm 10,3$
7.	1,0 x 0	55,5	40,0	5,5	26,7	73,3	$\pm 11,4$
8.	1,0 x 0,05	28,9	60,0	11,1	14,3	85,7	$\pm 9,3$
9.	1,0 x 0,1	11,1	66,7	22,2	13,3	86,7	$\pm 8,7$
10.	1,5 x 0	47,7	35,7	16,7	26,7	73,3	$\pm 11,4$
11.	1,5 x 0,05	26,3	57,1	16,7	26,7	73,3	$\pm 11,4$
12.	1,5 x 0,1	23,4	60,0	16,7	6,7	93,7	$\pm 6,4$

<sup>2</sup>s indica o desvio padrão obtido através da análise binomial.

<sup>3</sup> Altura 1 (<0,5 cm)

Altura 2 (0,5 a 1,0 cm)

Altura 3 (>1,0 cm)

anterior. As brotações tipo 2 e 3 obtidas permitiram elevar a taxa de multiplicação de alguns tratamentos pela segmentação das mesmas. Por esta razão, o meio de cultura adequado no primeiro subcultivo, com  $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$  de BAP e  $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$  de ANA, parece estar próximo do mais indicado para a multiplicação do *Eucalyptus viminalis*.

### 4.3 ALONGAMENTO DE BROTAÇÕES

#### 4.3.1 Experimento 1 de Alongamento

As médias de alturas de brotações de *E. viminalis* neste experimento encontram-se sumarizadas na tabela 7. Com base na análise de variância, verificou-se significância para os fatores meio e suplementação com nitrogênio isoladamente, e para a combinação de meio x regime de luz e meio x suplementação de nitrogênio (Anexo 3). Entretanto não se observou interação entre as demais combinações dos fatores empregados.

A combinação de meio MS com adição suplementar de nitrogênio na presença de luz permitiu o maior alongamento in vitro das brotações, com média de 1,3 cm para a altura. Este tratamento foi significativamente superior aos demais, sendo seguido pelo tratamento que combinou o mesmo meio na ausência de luz, com média de 1,0 cm em altura (Tabela 7). O meio MS, em relação ao MS/2, foi superior para o alongamento, possibilitando a obtenção de brotações significativamente mais alongadas. Portanto, a redução da concentração de sais no meio de cultura não é indicada para o alongamento de brotações desta espécie.

A adição suplementar de N permitiu um aumento significativo na altura das brotações ao se comparar com meio sem tal suplementação (Tabelas 7, 8 ou 9).

TABELA 7. EFEITO DO MEIO DE CULTURA, ADIÇÃO SUPLEMENTAR DE NITROGÊNIO E REGIME DE LUZ SOBRE A ALTURA DE BROTAÇÕES DE *Eucalyptus viminalis*, APÓS QUATRO SEMANAS DE INCUBAÇÃO

ALTURA DAS BROTAÇÕES					
----- (cm) -----					
REGIME DE	MS		MS/2		Média <sup>z</sup>
LUZ	NORMAL	COM N SUPLEMENTAR	NORMAL	COM N SUPLEMENTAR	
COM LUZ	0,74	1,3	0,78	0,73	0,88 a
SEM LUZ	0,68	1,0	0,86	0,76	0,83 a
Média	0,94 a		0,78 b		

<sup>z</sup>médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

TABELA 8. EFEITO DO MEIO DE CULTURA ASSOCIADO ADIÇÃO SUPLEMENTAR DE NITROGÊNIO SOBRE A ALTURA DE BROTAÇÕES DE *Eucalyptus viminalis*, APÓS QUATRO SEMANAS DE INCUBAÇÃO

MEIO DE CULTURA	ALTURA DAS BROTAÇÕES (cm)		Média <sup>z</sup>
	NITROGÊNIO		
	NORMAL	SUPLEMENTAR	
MS	0,71	1,16	0,94 a
MS/2	0,81	0,74	0,78 b
Média	0,76 b	0,95 a	

<sup>z</sup>médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

TABELA 9. EFEITO DA ADIÇÃO SUPLEMENTAR DE NITROGÊNIO ASSO-  
CIADA COM O REGIME DE LUZ SOBRE A ALTURA DE BROTA-  
ÇÕES DE *Eucalyptus viminalis*, APÓS QUATRO SEMANAS  
DE INCUBAÇÃO

REGIME DE LUZ	ALTURA DAS BROTAÇÕES		Média <sup>z</sup>
	(cm)		
	NITROGÊNIO		
	NORMAL	SUPLEMENTAR	
AUSÊNCIA	0,77	0,9	0,83 a
PRESENÇA	0,75	1,0	0,88 a
Média	0,76 b	0,95 a	

<sup>z</sup>médias seguidas pela mesma letra não diferem estatística-  
mente entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

O alongamento das brotações não foi afetado pela manutenção das culturas sob regime de luz ou escuro, durante as 2 semanas iniciais de incubação, como pode ser observado na tabela 7.

Apesar de se ter detectado diferenças entre os tratamentos quanto ao alongamento; em termos práticos, o incremento obtido para a altura não foi suficiente para utilização das brotações na fase subsequente de enraizamento. Isto levou à condução de novo experimento, testando-se outros fatores relacionados com o alongamento, visando a obtenção de brotações mais alongadas.

#### 4.3.2 Experimento 2 de Alongamento

A análise de variância efetuada neste experimento detectou significância para o ácido giberélico ( $GA_3$ ), carvão ativado (C.A.) e ácido indolbutírico (AIB), isoladamente, e para a combinação de  $GA_3$  com C.A. (Anexo 4). Entretanto, não se observou significância para as demais combinações dos fatores testados.

De acordo com a tabela 10, o alongamento das brotações neste experimento foi maior que o obtido no experimento anterior. O melhor resultado foi alcançado quando se suplementou meio MS com  $15 \text{ mg.l}^{-1}$  de C.A., obtendo-se uma altura média das brotações de 1,85 cm. Entretanto tal tratamento



TABELA 10. MÉDIAS DE ALONGAMENTO DE BROTAÇÕES DE *Eucalyptus viminalis* COMO EFEITO DO USO COMBINADO DE C.A., GA<sub>3</sub> E AIB, APÓS QUATRO SEMANAS DE INCUBAÇÃO

	TRATAMENTOS			ALTURA MÉDIA <sup>z</sup> (cm)	
	GA <sub>3</sub> --(mg.l <sup>-1</sup> )--	AIB --(mg.l <sup>-1</sup> )--	C.A. --(g.l <sup>-1</sup> )--		
1.	0,0	0,0	0	1,07	cde
2.	0,1	0,0	0	0,76	de
3.	1,0	0,0	0	0,82	de
4.	0,0	0,1	0	0,78	de
5.	0,1	0,1	0	0,69	e
6.	1,0	0,1	0	0,66	e
7.	0,0	0,0	15	1,85	a
8.	0,1	0,0	15	1,43	abc
9.	1,0	0,0	15	1,03	cde
10.	0,0	0,1	15	1,64	ab
11.	0,1	0,1	15	1,21	bcd
12.	1,0	0,1	15	1,10	cde

<sup>z</sup>médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

não diferiu dos tratamentos que utilizaram C.A. com adição de  $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$  de AIB ou  $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$  de GA<sub>3</sub>, que forneceram médias respectivamente de 1,64 e 1,43 cm para a altura.

Neste experimento, a utilização de C.A. em meio MS favoreceu o alongamento de brotações de *E. viminalis* tendo sido melhor o efeito quando empregado isoladamente ou em combinação com  $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$  de AIB (Tabela 10). Este resultado contraria o obtido por CUNNINGHAM & MOTT<sup>10</sup> para esta espécie, os quais encontraram que a adição de carvão em meio de cultura foi ineficaz para o alongamento. Entretanto, AHUJA<sup>01</sup> observou que tal adição resultou em aumento na altura das brotações e tamanho das folhas de *E. citriodora* Hook.

Analisando-se o GA<sub>3</sub> observou-se que a ausência deste fator foi mais favorável para o alongamento das brotações (Tabela 11). Estes resultados indicam um efeito prejudicial do mesmo sobre o alongamento, quando adicionado no meio de cultura (Figura 9).

Quanto ao AIB, isoladamente, este fator mostrou de um modo geral, efeito igualmente prejudicial para o crescimento em altura, quando presente no meio de cultura (Tabela 12). Meio com C.A. forneceu as brotações mais alongadas em comparação com meio sem este fator, em todos os níveis de GA<sub>3</sub> testados (Tabela 11). A presença de GA<sub>3</sub> em meio com C.A. foi prejudicial ao alongamento, tendo sido o melhor resultado obtido em meio onde se suprimiu tal fator (média de 1,75 cm). A altura não foi afetada pelo uso de  $0,1$  ou  $1 \text{ mg.l}^{-1}$  de GA<sub>3</sub>.

TABELA 11. EFEITO DO C.A. ASSOCIADO COM  $GA_3$  SOBRE A ALTURA DE BROTAÇÕES DE *Eucalyptus viminalis*, APÓS QUATRO SEMANAS DE INCUBAÇÃO

ALTURA DAS BROTAÇÕES (cm)				
C.A.	GA <sub>3</sub>			Média <sup>z</sup>
(mg.l <sup>-1</sup> )	(mg.l <sup>-1</sup> )			
	0,0	0,1	1,0	
0	0,98	0,73	0,72	0,81 b
15	1,75	1,29	1,07	1,38 a
Média	1,38 a	1,02 b	0,91 b	

<sup>z</sup>médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

FIGURA 9. EFEITO DO  $GA_3$ , EM COMBINAÇÃO COM C.A. E AIB, SOBRE A ALTURA DE BROTAÇÕES DE *Eucalyptus viminalis*, APÓS QUATRO SEMANAS DE INCUBAÇÃO

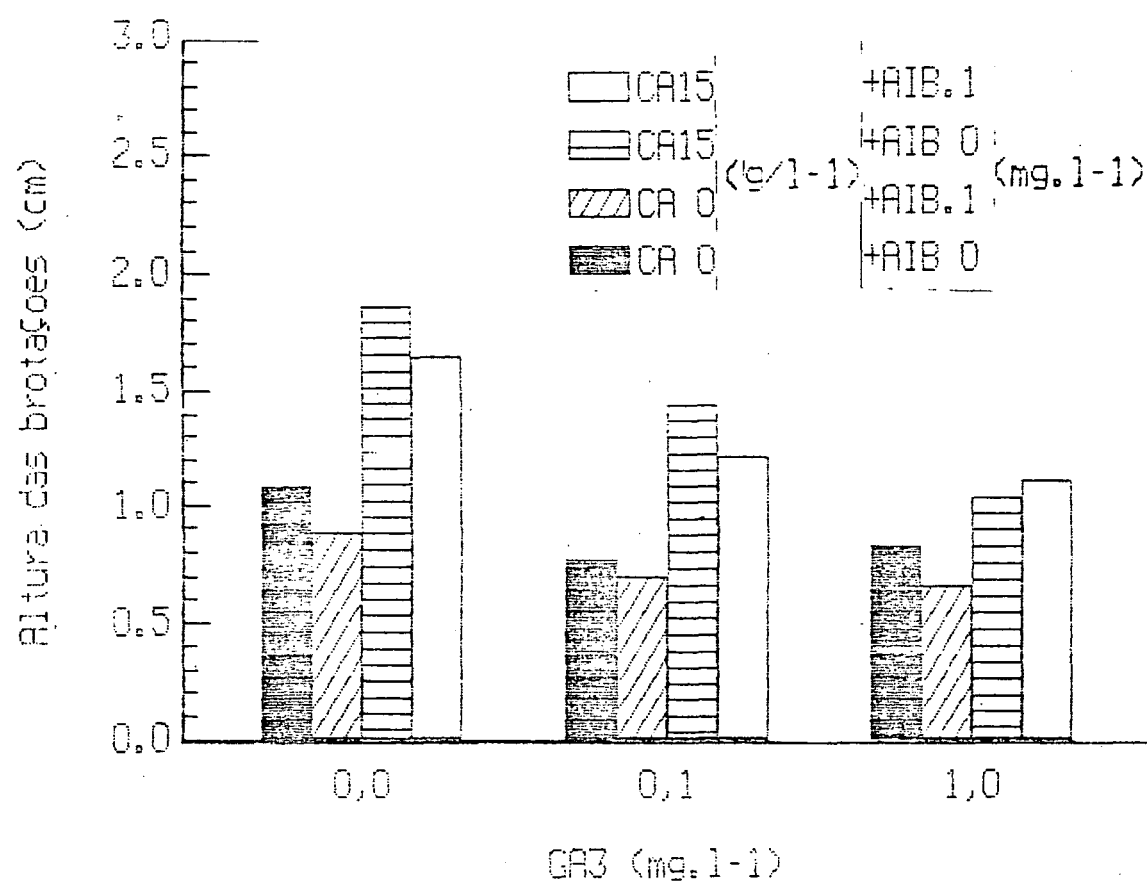


TABELA 12. EFEITO DO C.A. ASSOCIADO COM AIB SOBRE A ALTURA DE BROTAÇÕES DE *Eucalyptus viminalis*, APÓS QUATRO SEMANAS DE INCUBAÇÃO

ALTURA DAS BROTAÇÕES (cm)			
AIB (mg.l <sup>-1</sup> )	C.A. (g.l <sup>-1</sup> )		Média <sup>z</sup>
	0	15	
0,0	0,87	1,44	1,16 a
0,1	0,74	1,29	1,02 b
Média	0,81 b	1,38 a	

<sup>z</sup>médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

A associação de C.A. com AIB indicou, em termos gerais, que meio apenas com C.A. foi mais eficaz para o crescimento em altura das brotações, com média de 1,44 cm (Tabela 12).

Estudando-se o efeito combinado do  $GA_3$  com AIB, brotações mais alongadas, com média de 1,46 cm de altura, puderam ser obtidas quando ambos fatores foram suprimidos do meio de cultura (Tabela 13).

Os resultados obtidos contrariam a expectativa do efeito de uso do  $GA_3$ , considerando a resposta favorável que esta substância tem apresentado sobre o alongamento de *Eucalyptus* em cultura. FRANCOLET & BOULAY<sup>19</sup> obtiveram considerável alongamento de brotações de *E. gunnii* e *E. dalrympleana* em meio com  $1 \text{ mg.l}^{-1}$  de  $GA_3$  e  $15 \text{ g.l}^{-1}$  de C.A. as quais apresentaram folhas com a morfologia típica das espécies. Por outro lado, PINEDO<sup>43</sup> obteve o maior incremento na altura de brotações de *E. tereticornis* ao utilizar  $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$  de  $GA_3$  isoladamente. Entretanto, segundo este autor, maiores concentrações de  $GA_3$  na presença de C.A., forneceram maior percentagem de brotações deterioradas e mortas.

Neste experimento obteve-se brotações alongadas com características típicas da espécie em todos os tratamentos onde se empregou carvão ativado. Este fator mostrou-se fundamental na obtenção de folhas finas, compridas e bem desenvolvidas, distribuídas em verticilos bem definidos com coloração verde-escura típica da espécie.

TABELA 13. EFEITO DO  $GA_3$  ASSOCIADO COM AIB SOBRE A ALTURA DE BROTAÇÕES DE *Eucalyptus viminalis*, APÓS QUATRO SEMANAS DE INCUBAÇÃO

ALTURA DAS BROTAÇÕES (cm)				
AIB. (mg.l <sup>-1</sup> )	GA <sub>3</sub> (mg.l <sup>-1</sup> )			Média <sup>z</sup>
	0,0	0,1	1,0	
0,0	1,46	1,1	0,91	1,16 a
0,1	1,25	0,92	0,88	1,02 b
Média	1,38 a	1,02 b	0,91 b	

<sup>z</sup>médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

A ausência de C.A. no meio provocou o desenvolvimento de folhas com coloração verde-clara e o aparecimento de callosidade na base das brotações. Em tais meios, observou-se deterioração das mesmas após a 4ª semana de incubação.

Desta forma, ao se aliar a altura com o aspecto das brotações verificou-se que o meio MS suplementado apenas com 15 mg.l<sup>-1</sup> de carvão ativado foi o mais adequado para o alongamento in vitro de brotações desta espécie.



#### 4.4 ENRAIZAMENTO

O melhor resultado para o enraizamento de brotações de *Eucalyptus viminalis* foi obtido em meio MS/2 suplementado com  $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$  de AIB, o qual permitiu que 66,6 % dos explantes enraizassem (Tabela 14). Na sequência, o tratamento em meio MS/2 suplementado com  $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$  de AIB e  $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$  de KIN apresentou média de 50 % de enraizamento, não diferindo estatisticamente do anterior.

No presente estudo, o meio MS/2 foi mais eficaz para o enraizamento ao se comparar com o meio MS (Tabela 15). Considerando o total de brotações enraizadas (100 %), apenas 22,2 % enraizaram em meio MS enquanto 77,8 % restantes enraizaram no MS/2.

Da mesma forma, o uso de  $0,5$  ou  $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$  de AIB foi mais favorável ao enraizamento do que a concentração  $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ . Entretanto não se observou aumento no enraizamento ao se elevar a concentração de AIB de  $0,5$  para  $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$ .

Ao se analisar o efeito isolado da cinetina, nota-se não ter havido diferença entre o uso ou não deste fator no meio de enraizamento. Entretanto, o emprego de  $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$  de KIN permitiu uma porcentagem de enraizamento ligeiramente maior quando comparado com meio sem tal regulador.

Observa-se pela figura 10 aumento no enraizamento das brotações, associado com a redução das concentrações de sais minerais do meio MS, em todas as concentrações de AIB testadas. Este efeito foi maior na concentração  $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$  de AIB. O meio de cultura e o AIB foram os fatores mais im-

TABELA 14. EFEITO DA COMBINAÇÃO DE MEIO DE CULTURA, AIB E KIN SOBRE O ENRAIZAMENTO DE BROTAÇÕES DE *Eucalyptus viminalis*, APÓS SEIS SEMANAS DE INCUBAÇÃO

	TRATAMENTOS			ENRAIZAMENTO (% $\pm$ s) <sup>z</sup>
	MEIO	AIB ----- (mg. l <sup>-1</sup> ) -----	KIN ----- (mg. l <sup>-1</sup> ) -----	
1.	MS	0,1	0,0	5,5 $\pm$ 5,4
2.	MS	0,5	0,0	---
3.	MS	1,0	0,0	16,7 $\pm$ 8,7
4.	MS	0,1	0,1	22,2 $\pm$ 9,8
5.	MS	0,5	0,1	11,1 $\pm$ 7,4
6.	MS	1,0	0,1	16,7 $\pm$ 8,7
7.	MS/2	0,1	0,0	22,2 $\pm$ 9,8
8.	MS/2	0,5	0,0	66,6 $\pm$ 11,1
9.	MS/2	1,0	0,0	33,3 $\pm$ 11,1
10.	MS/2	0,1	0,1	22,2 $\pm$ 9,8
11.	MS/2	0,5	0,1	38,8 $\pm$ 11,5
12.	MS/2	1,0	0,1	50,0 $\pm$ 11,8

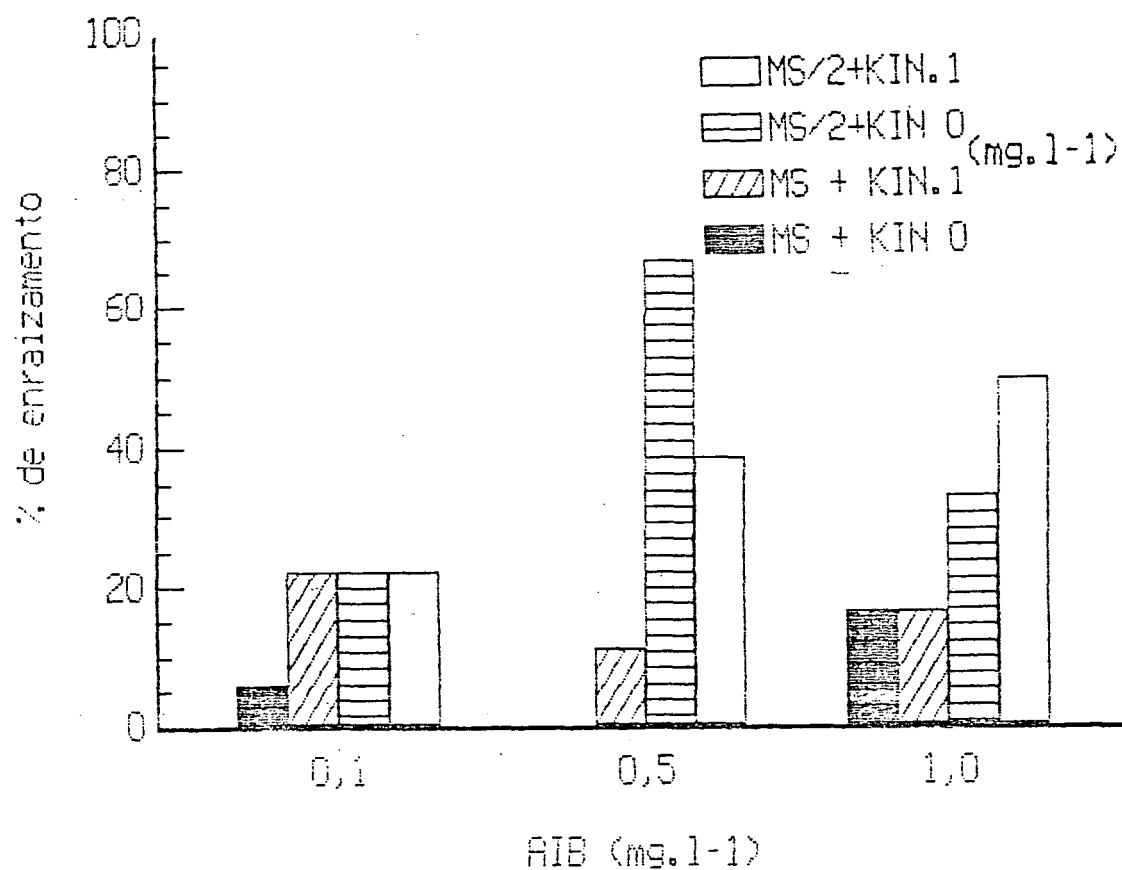
<sup>z</sup>s indica o desvio padrão obtido através da análise binomial.

TABELA 15. EFEITO RELATIVO DO MEIO DE CULTURA, AIB E KIN SOBRE O ENRAIZAMENTO TOTAL E ASPECTO DAS BROTAÇÕES DE *Eucalyptus viminalis*, APÓS SEIS SEMANAS DE INCUBAÇÃO

FATORES/ NÍVEIS	ENRAIZA- MENTO (%)	ASPECTO DAS BROTAÇÕES			
		-----(% $\pm$ s) <sup>z</sup> -----			
		ALONG.	CALOSIDADE		
			Pequena	Média	Excessiva
-----MEIO-----					
MS	22,2 $\pm$ 5,6 <sup>z</sup>	44,4 $\pm$ 8,3	50,0 $\pm$ 6,8	46,3 $\pm$ 4,8	59,2 $\pm$ 7,0
MS/2	77,8 $\pm$ 5,6	55,6 $\pm$ 8,3	50,0 $\pm$ 6,8	53,7 $\pm$ 4,8	40,8 $\pm$ 7,0
-----AIB(mg.l <sup>-1</sup> )-----					
0,1	22,2 $\pm$ 5,6	80,5 $\pm$ 8,2	63,8 $\pm$ 4,8	27,8 $\pm$ 4,3	8,2 $\pm$ 3,9
0,5	38,9 $\pm$ 4,7	13,9 $\pm$ 5,7	24,2 $\pm$ 5,8	38,0 $\pm$ 4,7	36,7 $\pm$ 6,9
1,0	38,9 $\pm$ 4,7	5,6 $\pm$ 3,8	12,0 $\pm$ 4,6	34,2 $\pm$ 4,6	55,1 $\pm$ 7,1
-----KIN(mg.l <sup>-1</sup> )-----					
0,0	46,3 $\pm$ 6,8	69,5 $\pm$ 7,7	81,0 $\pm$ 5,3	49,0 $\pm$ 4,8	18,3 $\pm$ 5,5
0,1	53,7 $\pm$ 6,8	69,5 $\pm$ 7,7	19,0 $\pm$ 5,3	51,0 $\pm$ 4,8	81,7 $\pm$ 5,5

<sup>z</sup>s indica o desvio padrão obtido através da análise binomial.

FIGURA 10. EFEITO DO MEIO DE CULTURA E KIN., DENTRO DO FATOR AIB, SOBRE O ENRAIZAMENTO DE BROTAÇÕES DE *Eucalyptus viminalis*, APÓS SEIS SEMANAS DE INCUBAÇÃO



portantes relacionados com o enraizamento de brotações de *Eucalyptus viminalis*, neste estudo.

Quanto à qualidade das brotações obtidas, meio com  $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$  de AIB forneceu brotações de melhor aspecto (Tabela 15). Neste caso obteve-se o maior percentual de brotações alongadas com reduzida calosidade na base, em comparação com concentrações mais elevadas deste regulador. Desta forma, um balanço entre  $0,1$  e  $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$  de AIB parece ser o mais favorável para o enraizamento e aspecto das brotações. A ausência de KIN permitiu a obtenção de brotações com menor calosidade. Entretanto, a qualidade das brotações não foi afetada pela concentração de sais minerais no meio de cultura.

O enraizamento obtido para o *Eucalyptus viminalis* neste estudo foi maior que o obtido por MEHRA-PALITA<sup>39</sup> para a mesma espécie. Este autor encontrou enraizamento de apenas 25 % das brotações em meio de GRESSHOF & DOY (GD) suplementado com  $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$  de AIB.

Este estudo mostra um percentual de enraizamento intermediário para o *E. viminalis*, quando comparado com plântulas de outras espécies regeneradas através da micropropagação. Para *E. grandis* L, SANKARA & VENKATESWARA<sup>44</sup> obtiveram 60 % de enraizamento para explantes juvenis e 35 % para explantes adultos. Trabalhando com a mesma espécie, SITA & RANI<sup>46</sup> encontraram enraizamento em 70 % das brotações. FURZE & CRESSWELL<sup>21</sup>, trabalhando com segmentos nodais de mudas, obtiveram enraizamento em 90 % das brotações de *E. grandis* e 80 % para *E. nitens*, com sobrevivência de 90 % das plântu-

las, para ambas espécies, após o período de aclimação. Já FINEDO<sup>43</sup>, encontrou um percentual de enraizamento de 86,7 e 100 %, respectivamente para *E. citriodora* e *E. tereticornis*.

## 5 CONCLUSÕES

1. Pode ser obtida a regeneração de plantas de *Eucalyptus viminalis* a partir da micropropagação de mudas.

2. O melhor tratamento de desinfestação dos segmentos nodais é o uso de 1 % de hipoclorito de sódio por 10 min, através do qual se obteve 0 % de contaminação, 20 % de oxidação e 100 % de sobrevivência dos explantes.

3. Brotações múltiplas de aspecto satisfatório podem ser obtidas utilizando-se o meio MS suplementado com  $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$  de BAP e  $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$  de ANA, sendo que este tratamento resultou em 4,6 brotações multiplicadas/explante. A taxa máxima de multiplicação foi de 5 a 6 brotações multiplicadas/explante.

4. O alongamento das brotações de *Eucalyptus viminalis* não foi obtido em meio de multiplicação. Ele foi conseguido após transferência das brotações multiplicadas para um meio suplementado com  $15 \text{ g.l}^{-1}$  de carvão ativado. Este fator é o mais importante com relação ao crescimento em altura das brotações. Ao contrário do esperado, o GAg teve um efeito negativo, nas concentrações empregadas, sobre o crescimento em altura das brotações.

5. O melhor enraizamento (de 66,6%) foi obtido utilizando o meio MS/2 suplementado com  $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$  de AIB, que foi uma dosagem intermediária entre as testadas.

6. A metodologia desenvolvida contribuiu para um aumento na taxa de multiplicação e enraizamento do *Eucalyptus viminalis* quando comparada com outros estudos efetuados para a mesma espécie.

7. A técnica desenvolvida poderá contribuir para a produção de matrizes selecionadas para uso em programas de melhoramento genético florestal, ou ainda servir como base na propagação massal de genótipos superiores da espécie.



## ANEXOS

TABELA 1A. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA MULTIPLICAÇÃO DE BROTA-  
ÇÕES NO SUBCULTIVO 1

QUADRO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

F.V.	G.L.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
ANA	3	28,2870	2,5104	0,05856
BAP	2	42,5516	3,7763	0,02379
ANA x BAP	6	2,4798	0,2201	0,96880
RESÍDUO	211	11,2679		
TOTAL	222			

Nº de brotações: observações não transformadas

Média geral = 3,5784

Coeficiente de Variação = 93,805 %

TABELA 2A. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA MULTIPLICAÇÃO DE BROTA-  
ÇÕES NO SUBCULTIVO 2

QUADRO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

F.V.	G.L.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
BAP	2	45,6083	9,2571	0,00040
ANA	3	10,2972	2,0900	0,10440
ANA x BAP	6	3,9639	0,8045	0,56990
RESÍDUO	108	4,9269		
TOTAL	119			

Nº de brotações: observações não transformadas

Média geral = 3,9083

Coeficiente de Variação = 56,793 %

TABELA 3A. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO ALONGAMENTO DE BROTAÇÕES  
EXPERIMENTO 1

QUADRO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA				
F.V.	G.L.	Q.M.	VALOR F	PROB. >F
MEIO	1	0,9827	11,1130	0,00146
NIT	1	1,4340	16,2168	0,00025
LUZ	1	0,1057	1,1956	0,27540
MEIOxNIT	1	2,6949	30,4757	0,00001
MEIOxLUZ	1	0,4544	5,1387	0,02333
NITxLUZ	1	0,1635	1,8499	0,17236
MEIOxNITxLUZ	1	0,0604	0,6835	0,58518
RESÍDUO	151	0,0884		
TOTAL	158			

Altura das brotações (cm): observações não transformadas

Média geral = 0,86

Coeficiente de Variação = 34,437

TABELA 4A. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO ALONGAMENTO DE BROTAÇÕES  
EXPERIMENTO 2.

QUADRO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA				
F.V.	G.L.	Q.M.	VALOR F	PROB. >F
GA <sub>3</sub>	2	4,7675	26,4515	0,00001
CARVÃO	1	18,9741	105,2734	0,00001
AIB	1	1,1301	6,2700	0,01247
GA <sub>3</sub> ×CAR	2	0,9216	5,1130	0,00697
GA <sub>3</sub> ×AIB	2	0,1931	1,0717	0,34495
CAR×AIB	1	0,0027	0,0149	0,89854
GA <sub>3</sub> ×CAR×AIB	2	0,1868	1,0367	0,35742
RESÍDUO	226	0,1802		
TOTAL	237			

Altura das brotações (cm): observações não transformadas

Média geral = 1,10

Coeficiente de Variação = 38,683 %

## ABSTRACT

Plant regeneration of *Eucalyptus viminalis* Labill. was achieved by the use of micropropagation technique. Nodal segments about 1 cm long obtained from 1-year old seedlings, were disinfected in a 1 or 2 % sodium hypochlorite solution during 5, 10 or 15 min. These segments were precultured on a half-strength MURASHIGE & SKOOG (MS/2) medium, supplemented with sucrose (2 % W/V), agar (0.8 % W/V) vitamins as described by GAMBORG & WETTER, 6-benzilaminopurine (BAP) and  $\alpha$ -naphthaleneacetic acid (NAA) both at  $0.1 \text{ mg.l}^{-1}$ . Explants dipped in 1 % sodium hypochlorite solution for 10 min showed lower contamination and oxidation rates than other treatments. Considering the morphological aspect of the shoots, optimal shoot proliferation (4.6 induced shoots/explant each 8 weeks) was achieved by adding  $0.2 \text{ mg.l}^{-1}$  of BAP and  $0.1 \text{ mg.l}^{-1}$  of NAA to the MS medium. Maximum shoot proliferation was 5 to 6 shoots/explant. The use of  $15 \text{ g.l}^{-1}$  of activated charcoal in the MS medium resulted in the most elongated shoots and recovered the morphological characteristics of the species. Gibberellic acid was detrimental for shoot elongation. Roots were initiated on 66.6 % of the elongated shoots by culturing on a half-strength MS with  $0.5 \text{ mg.l}^{-1}$  of indole-3-butyric acid (IBA). Half-strength MS medium was more effective than MS for rooting of this species.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AHUJA, A. In vitro shoot differentiation in *Eucalyptus citriodora* Hook: effect of activated charcoal. Indian Journal of Forestry, 8 (4):340-1, 1985.
2. ANEJA, S. & ATAL, C.K. Plantlet formation in tissue culture from lignotubers of *Eucalyptus citriodora* Hook. Curr. Sci., 32 (3):69, 1969.
3. BACHELARD, E.P. & STOWE, B.B. Growth in vitro of roots of *Acer rubrum* L. and *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. Physiol. Plant., 14:20-30, 1963
4. BARKER, P.K.; DE FOSSARD, R.A. & BOURNE, R.A. Progress toward clonal propagation of *Eucalyptus* species by tissue culture techniques. Proc. Int. Plant Propagator's Soc., 22:546-56, 1977.
5. BENNETT, I.J. & McCOMB, J.A. Propagation of Jarrah (*Eucalyptus marginata*) by organ and tissue culture. Aust. For. Res., 12:121-7, 1982.
6. BOLAND, D.J.; BROOKER, M.I.H.; CHIPPENDALE, G.M.; HALL, N.; HYLAND, B.P.M.; JOHNSTON, R.D.; KLEINIG, D.A. & TURNER, J.D. Forest trees of Australia. 4.ed. Melbourne, Australia, Thomas Nelson Australia, 1984, 687p.
7. BONGA, J.M. & DURZAN, D.J. Tissue culture in forestry. 2.ed. Dordrecht, Martins Nijhoff, 1985, 420 p.
8. CHÉE, R. Micropropagation: can nurserymen afford to ignore it? Am. Nurseryman, 152 (8):89-103, 1984.
9. CRESSWELL, R.J. & DE FOSSARD, R.A. Organ culture of *Eucalyptus grandis*. Aust. For., 32 (1):55-69, 1974.

10. CUNNINGHAM, M.W. & MOTT, R.L. Micropropagation of *Eucalyptus viminalis*. In: Southern Forest Tree Improvement Conference, 18, Long Beach, 1985. Proceedings, Long Beach, Mississippi, 1985, p. 54-63
11. DAVIDSON, J. Problems of vegetative propagation of *Eucalyptus*. Separata de: WORLD CONSULTATION ON FOREST TREE BREEDING, 3., Canberra, 1977. p. 857-82.
12. DE FOSSARD, R.A. & BOURNE, R.A. Clonal propagation of *Eucalyptus* by nodal culture. In: THIRD WORLD CONSULTATION ON FORESTRY TREE BREEDING, Canberra, 1977. Canberra, Australia, FAO, 1977, p.1023-29.
13. DE FOSSARD, R.A.; NITSCH, C.; CRESSWELL, R.J. & LEE, E.C.M. Tissue and organ culture of *Eucalyptus*. N.Z. J. For. Sci., 4(2):267-78, 1974.
14. DURAND-CRESSWELL, R. & NITSCH, C. Factors influencing the regeneration of *Eucalyptus grandis* by organ culture. Acta Hort., 28:149-55, 1977.
15. DURAND-CRESSWELL, R.; BOULAY, M. & FRANCIET, A. Vegetative propagation of *Eucalyptus*. In: BONGA, J.M. & DURZAN, D.J. Tissue culture in forestry, Dordrecht, Holanda, 1985, p. 150-81
16. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisas de Florestas, Curitiba, PR. Zonamento ecológico para plantios florestais no estado do Paraná. Brasília, EMBRAPA-DDT, 1986. 89 p.



17. FISHWICK, R. W. Comportamento de espécies/procedências de Eucalyptus na região sul do Brasil diante da geada de 1975. Brasília, PRODEPEF, 1976. 20 p. (Comunicação técnica,3).
18. FONSECA, S.M. da. Resultados e perspectivas do programa de melhoramento genético com eucaliptos, conduzidos pelo IPEF, na região sul do Brasil. Boletim informativo do IPEF, 2 (21):1-37, 1979.
19. FRANCKET, A. & BOULAY, M. Micropropagation of frost resistant eucalypt clones. Australian Forestry Research. 13:83-9, 1982
20. FREITAS, A. R. Madeira para reflorestamento. In: ENCONTRO NACIONAL DE REFLORESTADORES, 7., Curitiba, 1983, Anais, Curitiba, 1983, painel 1-7.
21. FURZE, M.J. & CRESWELL, C.F. Micropropagation of Eucalyptus grandis and E. nitens using tissue culture techniques. South African Forestry Journal, 135 (12): 20-23, 1985.
22. GAMBORG, O.L. & WETTER, L.R. Plant tissue culture methods. Saskatoon, National Research Council of Canada, 1975, 109 p., p. 91.
23. GEORGE, E.F. & SHERRINGTON, P.D. Plant propagation by tissue culture. handbook and directory of commercial laboratories, 1984, 690 p., p.2.
24. GONÇALVES, A.N. Reversão à juvenilidade e clonagem de Eucalyptus urophylla. S.L. Blake in vitro. Piracicaba, 1982, 97 p. Tese, Doutorado, Universidade de São Paulo.

25. GREWAL, S.; AHUJA, A. & ATAL, C.K. In vitro proliferation of shoot apices of *Eucalyptus citriodora* Hook. Indian Journal Experimental Biology, 18:775-77, 1980.
26. GUPTA, P.K.; MASCARENHAS, A.F. & JAGANNATHAN, V. Tissue culture of forest trees- clonal propagation of mature trees of *Eucalyptus citriodora* Hook. by tissue culture. Plant Science Letters, 20:195-201, 1981.
27. HARTNEY, V.J. Tissue culture of *Eucalyptus*. Proc. Int. Plant Propagator's Soc., 32:98-109, 1982.
28. HARTNEY, V.J. Vegetative propagation of eucalypts. Aust. For. Res., 10:191-211, 1980.
29. HARTNEY, V.J. & BARKER, P.K. Vegetative propagation of *Eucalyptus* by tissue culture. In: SIMPÓSIO IUFRO EM MELHORAMENTO GENÉTICO E PRODUTIVIDADE DE ESPÉCIES FLORESTAIS DE RÁPIDO CRESCIMENTO, Águas de São Pedro, 1980. Anais, São Paulo, SBS, 1983, p. 791-93.
30. HASNAIN, S. & CHELIAK, W. Tissue culture in forestry: economic and genetic potential. The Forestry Chronicle, 62 (4):219-25, 1986.
31. IKEMORI, K.Y. Epicormic shoots from the branches of *Eucalyptus grandis* as an explant source for in vitro culture. The Commonwealth Forestry Review, 66(4):351-356, 1987.
32. JELASKA, S. & BORNMAN, C.H. Application of cell culture methods in forestry. In: IUFRO WORLD CONGRESS, 18th., LJUBLJANA, 1986. Forest Plants and Forest Protection. Viena, IUFRO, 1986, p. 554-64.

33. KARNOSKY, D.F. Potential for forest tree improvement via tissue culture. Bioscience, 31(2): 114-20, 1981.
34. KENGEN, S. The future trends of forestry sector and forestry policy in Brazil. In: SYMPOSIUM ON THE CO-OPERATION OF FORESTRY BETWEEN FINLAND AND BRAZIL, Helsinki, 1987. Proceedings ... Helsinki, The Finnish Forest Research Institute, 1987. p. 65-100
35. KITAHARA, E.H. & CALDAS, L.S. Shoot and root formation in hypocotyl callus culture of Eucalyptus. For. Sci., 21(3):242-3, 1975.
36. LEE, E.C.M. & DE FOSSARD, R.A. The effects of various auxins and cytokinins on the in vitro culture of stem and lignotubers tissues of Eucalyptus bancroftii Maiden. New Phytol., 73: 707-17, 1974.
37. MARCAVILLACA 4, M.C. & MONTALDI, E.R. Cultivo in vitro de tejidos de eucalipto. IDIA Supl. Forestal, 12:62-64, 1964.
38. McKEAND, S.E. & WEIR, R. Tissue culture & forest productivity. J. For., 82(4): 212-8, 1981.
39. MEHRA-PALTA, A. Clonal propagation of Eucalyptus by tissue culture. Plant Sci. Lett., 24:1-11, 1982.
40. MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., 15: 473-97, 1962.
41. NEL, P. M. Recent developments in biotechnology: possible applications to forest tree breeding in Southern Africa. South African Forestry Journal, 135 (12):40-42, 1985.

42. OKA, S.; YEUNG, E.C. & THORPE, T.A. Shoot formation in *Eucalyptus globulus* hypocotyl explants. New Zealand Journal of Forestry Science, 12(3):501-9, 1982.
43. PINEDO, D.N.H. Micropropagação de Eucalyptus citriodora e Eucalyptus tereticornis. Curitiba, 1989, 63 p. Tese, Mestrado, Universidade Federal do Paraná.
44. SANKARA, R.K. & VENKATESWARA, R. Tissue culture of forest trees: clonal multiplication of *Eucalyptus grandis* L. Plant Science, 40(1):51-55, 1985.
45. SITA, G.L. Morphogenesis and plant regeneration from cotyledonary culture of *Eucalyptus*. Plant Sci. Letters, 14:63-8, 1979.
46. SITA, G.L. & RANI, B.S. In vitro propagation of *Eucalyptus grandis* L. by tissue culture. Plant Cell Reports, 4:63-65, 1985.
47. TURNBULL, J.W. & BOULAND, D.J. *Eucalyptus*. Biologist, 31(1):49-56, 1984.
48. WILKINS, C. F.; CABRERA, J.L. & DODDS, P and J.H. Tissue culture propagation of trees. Outlook Agri., 13(1):1-13, 1985.